

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

E. A. P. DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Cariotipo y aspectos citogenéticos de *Dactylopius*
coccus Costa, 1835:**

"la cochinilla del carmín"

TESIS

para optar el título profesional de Biólogo con mención en Zoología

AUTORA

Sally Jesmille Molero Obregón

Lima-Perú

2009

*A mis padres con
Amor y Gritud.*

AGRADECIMIENTOS

A la Mg.Sc. Olga Bracamonte Guevara

Por su asesoría permanente en el desarrollo de la tesis y por las facilidades brindadas para la realización de la misma.

Al Dr. Misael Guevara

Por sus acertadas sugerencias desde un inicio, así como la ayuda en el análisis de los resultados y la búsqueda bibliográfica. Por brindarme las condiciones de laboratorio necesarias para la realización del presente trabajo.

A la Mg. María Siles Vallejos

Por su ayuda en la interpretación de los resultados y por al análisis crítico del mismo.
Por su apoyo a lo largo de la tesis y por su amistad.

Al Mg. Liberato Portillo

Profesor de la Universidad de Guadalajara, México
Por su ayuda con el material bibliográfico, por su confianza depositada en mi y en la presente investigación.

Al Mg. Sc. Gildardo Aquino Pérez

Colegio de Postgraduados San Luis de Potosí, México.
Por haberme facilitado material bibliográfico de primera calidad, particularmente por su
Tesis: **Estudio Cromosómico en cuatro tipos de cochinilla (*Dactylopius spp.*)**
(Homoptera: Dactylopiidae) del Nopal (*Opuntia spp.*)

A la Dra. Rina Ramírez Mesías

Por su orientación en el inicio de esta investigación y por sus palabras de aliento presentes en todo momento.

Al Blgo. José Pino y la Blga. Betty Shiga

Por las facilidades brindadas para la medición de los cromosomas.

A la Dra. Rosmarina Marín y a la Mg. Sc. Norberta Martínez.

Por la ayuda con la bibliografía sobre *Dactylopius coccus* Costa.

A los Blgos. Marielena Rodrigo, José Mejía y Rodolfo Velazco.

Por su apoyo en el desarrollo de la presente investigación, su amistad y su confianza.

A mis padres el Ing. Gustavo Molero y la Lic. Educ. Celia Obregón.

Por todo el apoyo brindado a lo largo de mi carrera, por su comprensión, sus enseñanzas, su amor y la energía positiva que siempre me transmiten.

A todos los amigos del Laboratorio de Citogenética

Por esos gratos momentos compartidos y por sus aportes en la presente investigación.

INDICE

Resumen.....	1
Abstract.....	2
1.Introducción.....	3
2. Antecedentes.....	5
2.1 <i>Dactylopius coccus</i> Costa “la cochinilla del carmín”.....	5
2.1.1 La importancia de <i>Dactylopius coccus</i> Costa en el mundo.....	5
2.1.2 Biología de <i>Dactylopius coccus</i> Costa.....	6
2.1.2.1 Ciclo de vida y los factores que influyen en su desarrollo.....	6
2.1.2.2 <i>Dactylopius coccus</i> Costa y la producción de ácido carmínico...7	
2.2 La importancia de los estudios del Cariotipo y la Citogenética.....	8
2.3 Los Cromosomas Holocéntricos.....	10
2.3.1 Características de los cromosomas holocéntricos.....	10
2.3.2 Los cromosomas holocéntricos en los insectos.....	11
2.3.3 Fusión y Fisión de los cromosomas holocéntricos.....	12
2.3.4 Avances moleculares en cromosomas holocéntricos.....	13
2.4 La evolución en los cóccidos.....	13
2.5 Heterocromatinización y determinación del Sexo.....	14
2.5.1 La Heterocromatina.....	14
2.5.2 La heterocromatinización y la determinación del sexo en los cóccidos.....	15
2.6 Poliploidía.....	17
2.7 Micronúcleos.....	18
3. Materiales y Métodos.....	19
3.1 Materiales.....	19
3.1.1 Material biológico.....	19
3.1.2 Material químico.....	19
3.1.3 Material de vidrio.....	19

3.1.4 Equipos e instrumentos.....	19
3.2 Metodología.....	20
3.2.1 Preparaciones Citológicas.....	20
3.2.2 Método estadístico.....	21
4. Resultados.....	23
4.1 Sobre la Metodología.....	23
4.2 Determinación del Cariotipo de <i>D. coccus</i>	24
4.3 Mitosis en células embrionarias de <i>D. coccus</i>	26
4.4 Poliploidía en células embrionarias de <i>D. coccus</i>	28
4.5 Presencia eventual de micronúcleos MN.....	30
5. Discusión de Resultados.....	31
5.1 Cariotipo de <i>D. coccus</i>	31
5.2 Mitosis en <i>D. coccus</i>	37
5.3 Células Poliploides en <i>D. coccus</i>	39
5.4 Presencia eventual de micronúcleos (MN).....	40
6. Conclusiones.....	41
7. Recomendaciones.....	42
8. Referencias Bibliográficas.....	43
9. Anexos.....	50
9.1 Longitud de los cromosomas metafásicos de <i>D. Coccus</i>	50
9.2 Placas metafásicas utilizadas al medir los cromosomas de <i>D. coccus</i>	70
9.3 Idiograma de <i>D. coccus</i>	90
9.4 Fusión y Heterocromatinización en los cromosomas de <i>D. coccus</i>	91
9.5 <i>D. coccus</i> en el laboratorio.....	93
9.6 Mapa Geográfico de San Bartolomé- Huarochirí- Lima.....	94

RESUMEN

Dactylopius coccus Costa, Dactylopiidae: Hemiptera, es un insecto parásito de las cactáceas y es muy apreciado por su contenido de ácido carmínico producto que es aprovechado por el hombre desde hace muchos siglos. Con el desarrollo de la biotecnología, la demanda del ácido carmínico se ha incrementado, por lo que se han venido desarrollando diferentes metodologías con el fin de mejorar la producción del mismo.

La Citogenética es una herramienta básica para la mejora de especies, además de su utilidad en otras áreas como la sistemática evolutiva, e ingeniería genética, este tipo de investigaciones en la cochinilla del carmín son de mucha importancia para el Perú, porque es el primer productor de carmín a nivel mundial.

En el presente trabajo se determinó el cariotipo de *Dactylopius coccus* Costa, obteniéndose que su número diploide es $2n=16$ cromosomas, todos son holocéntricos y disminuyen gradualmente en tamaño desde el primer par homólogo hasta el último. Así mismo se caracterizó la mitosis, que es particular por la naturaleza holocéntrica de los cromosomas y al estudiarse en células embrionarias se observó la heterocromatinización como mecanismo de determinación del sexo, donde la condensación de los cromosomas es homogénea en hembras y heterogénea en machos. Los procesos de poliploidía observados parecen estar relacionados con el desarrollo del embrión. Finalmente se observó la presencia eventual de micronúcleos, lo que resulta indicador de contaminación ambiental en la zona de colecta.

Palabras clave: *Dactylopius coccus* Costa, cariotipo, holocéntrico, heterocromatinización, poliploidía, micronúcleos.

ABSTRACT

Dactylopius coccus Costa, Dactylopiidae: Hemiptera, is a parasitic insect of the cactaceous ones and is very appreciated by its carminic acid content product that is profiteer by the man for many centuries. With the development of the biotechnology, the demand of carminic acid has been increased, reason why they have come developing different methodologies with the purpose of to improve the production of the same.

Cytogenetic is a basic tool for the improvement of species, besides its utility in other areas like evolutionary systematic, and genetic engineering, this type of investigations in the cochineal of the carmine one are of much importance for Peru because it is the first producer of carmine at world-wide level.

In the present work karyotype of *Dactylopius coccus* Costa was determined, obtaining itself that its diploide number is $2n=16$ chromosomes, all is holocentric and falls gradually in size from the first homologous pair to the last one. Also the mitosis was characterized, that is particular by the holocentric nature of the chromosomes and when studying in embryonic cells the heterochromatinization like mechanism of determination of sex was observed, where the condensation of the chromosomes is homogenous in females and heterogeneous in males. The observed processes of poliploidy seem to be related to the development of the embryo. Finally the possible presence of micronuclei was observed, which is indicating from environmental contamination in the zone of collection.

Key words: *Dactylopius coccus* Costa, karyotype, holocentric, heterochromatinization, poliploidy, micronuclei.

1. INTRODUCCIÓN

El género *Dactylopius* reúne especies de valor genético, ecológico y económico a nivel mundial. *Dactylopius coccus* Costa "la cochinilla del carmín" (llamada nocheztli por los aztecas, e induco por los mixtecos), es un pequeño insecto parásito de la tuna *Opuntia ficus -indica* y de otras especies de *Nopalea* y *Opuntia* (Ferris, 1955). Por paradójico que suene, la cochinilla siendo plaga es utilizada en Sudáfrica para el control biológico de varias especies de *Opuntia* que invaden los pastizales dedicados a la ganadería (García *et al.*, 1999). La cochinilla ha sido utilizada durante siglos desde el Pre clásico (100 a.C. a 100 d.C.) hasta nuestros días en la industria alimentaria, farmacéutica, textil, cosmética y cerámica debido a su contenido de ácido carmínico (De Lotto, 1974).

En el Perú, la cultura preincaica Paracas, cuya textilería tiene reconocimiento internacional por conseguir cerca de 190 tonalidades en sus telas, empleaba la cochinilla para los tonos que iban desde el rojo al violeta (Lock, 1997).

El género *Dactylopius* es netamente americano, así lo demuestran los estudios de filogenia, no está bien definido si su centro de origen es México o Perú (Portillo, 2005), sin embargo Rodríguez & Niemeyer (2000) afirman que *D. coccus* es una especie colonizadora en México y su centro de origen es el área andina central.

Cuando los españoles llegaron a América en el siglo XVI, se inició un intercambio de diferentes recursos, donde la cochinilla llegó a convertirse en el tercer artículo de exportación, sólo superado por el oro y la plata.

En 1820 la cochinilla llega en una muestra de nopales infestados del insecto a la sociedad económica de Cádiz, donde es reproducida eficientemente y en 1825 se introduce a *Dactylopius coccus* en las Islas Canarias, convirtiéndose en este lugar en la base de su economía y 45 años después, en 1870, Europa supera la producción de la cochinilla a América (Pérez & Becerra, 2001).

Tras siglos del exitoso uso de este recurso, en 1856, se produce el primer colorante artificial, con lo que la demanda de la cochinilla se reduce notablemente, siendo reemplazado por eritrosinas y anilinas. A mediados del siglo XX se reportan alergias provocadas por los colorantes artificiales y en la actualidad se sabe que son potencialmente cancerígenos (Saltzman, 1992), por lo que el carmín de la cochinilla resurge en el mercado global al considerársele inocuo.

A nivel mundial, Perú es el primer productor de cochinilla, seguido por Chile donde fue introducida en 1988 y en menos de diez años llegó a cubrir el 10 % de las exportaciones al mundo (Bustamante, 2002), el tercer productor son las Islas Canarias.

La ubicación taxonómica de la cochinilla del carmín, de acuerdo a Triplehorn y Jonson (2005) es:

Clase: Hexápoda
Orden: Hemíptera
Sub. Orden: Stenorrhyncha
Sup. Familia: Coccoidea
Familia: Dactylopiidae
Género: *Dactylopius*
Especie: *Dactylopius coccus* Costa (1835)

Los cóccidos, como son comúnmente llamados los insectos de la súper familia Coccoidea, tienen adaptaciones morfológicas muy distintas a los demás Hemípteros, dentro de las cuales resalta el hecho de que las hembras albergan los huevos en su cuerpo y la oviposición es lenta y asincrónica, por otro lado presentan una cubierta cerosa que los protege del ambiente y de sus enemigos naturales (Gullan & Korztarab, 1997). La alta similitud entre los miembros de Coccoidea ha generado complicaciones al momento de clasificarlos. Así la familia Dactylopiidae alberga solo al género *Dactylopius*, el cual a su vez reúne diez especies: *D. bassi*, *D. austrinus*, *D. ceylonicus*, *D. confertus*, *D. opuntiae*, *D. salmianus*, *D. tomentosus* , *D. zimmermanni*, *D.confusus* y *D.coccus*. Ésta última es la de mayor importancia por su alto contenido de ácido carmínico en comparación con las demás.

D. coccus tiene un marcado dimorfismo sexual, donde los machos son alados y sólo viven entre tres y cuatro días como adultos y las hembras son ápteras y viven más de cien días (Marín & Cisneros, 1977). El ciclo de vida está seriamente afectado por los factores externos como lluvias, temperatura, humedad relativa, predadores naturales, etc. (Díaz & Quispe, 1989; Rodríguez *et al.*, 2005; Romero *et al.*, 2006). La hembra grávida es utilizada en la industria por su mayor concentración de carmín y por su fácil colecta, razones por la cuales la presente investigación se realizará en hembras.

Los estudios de cariotipo proveen los datos del fenotipo de los cromosomas, en cuanto a su forma, tamaño y número, lo cual es de utilidad para conocer los arreglos cromosómicos que ha tenido determinado grupo en su especiación, también nos permite saber si es factible la realización de cruces interspecíficos con el fin de mejorar una especie.

En relación a *D. coccus* Costa, son pocos los trabajos que hacen referencia a su biología, morfología o ecología, la mayor parte de estos están orientados a los diversos métodos de infestación de las tunas teniendo como finalidad incrementar la producción de la cochinilla para luego industrializar el ácido carmínico. En el Perú no existen trabajos pioneros en citogenética de cochinilla, la mayoría de investigaciones de este tipo, se han realizado en vegetales o mamíferos, incluyendo al hombre.

Aquino (1991), en México, determinó que el número cromosómico de *D. coccus* es $2n=16$ cromosomas, de los cuales cuatro pares son más grandes que los otros y estos últimos cuatro pares se cree provengan del fraccionamiento del cromosoma grande presente sólo en especies silvestres y cuyo número diploide es $2n=10$, tanto para *D. confusus* como para otras dos especies no identificadas. Conociendo que el ambiente y la geografía tienen fuerte influencia en la fijación de los genes y la posterior adaptación y establecimiento de una especie, se pretende establecer las diferencias, si las hubiese, del complemento cromosómico de la especie en estudio bajo las condiciones geográficas y ambientales de San Bartolomé- Huarochirí-Lima.

Los puntos mencionados anteriormente justifican la realización de estudios citogenéticos en *D. coccus*, considerando además que Perú provee el 85% de este recurso al mundo (ADEX, 2006),

lo que hace necesario mejorar la calidad de los insumos que exportamos y así mantenernos en el mercado internacional como el primer productor de la grana fina.

Por otro lado, los cóccidos, al igual que muchos otros insectos se caracterizan por tener cromosomas holocéntricos, es decir con centrómero difuso y por ende con actividad cinetocórica a lo largo del cromosoma, confiriéndole características particulares tanto en la mitosis como en la meiosis. En la presente investigación, además de determinar el cariotipo de *D. coccus*, se caracterizará la división mitótica en células embrionarias, así mismo los aspectos citogenéticos relevantes.

2. ANTECEDENTES

2.1 La importancia de los estudios del Cariotipo y la Citogenética

El cariotipo es la suma de todos los rasgos estructurales de los cromosomas, incluyendo el número, tamaño y forma, que al ser constante nos proporciona una característica más del material biológico en estudio.

La Citogenética estudia el cromosoma (el material hereditario organizado) bajo cualquier nivel o dimensión" (Lacadena, 1996).

Para establecer el cariotipo se usan preferentemente cromosomas metafásicos ya que debido a su alta condensación se tornan muy evidentes las cromátidas y la posición de la constricción primaria o centrómero, lo cual es importante para la clasificación de acuerdo a la nomenclatura de Levan *et al.*(1964).

De acuerdo a su tamaño los cromosomas se clasifican en largos y cortos, así por ejemplo Lacadena (1996) hace mención que los cromosomas largos corresponden a las monocotiledóneas (*Trillium* 30 μ) y los cortos a la mayoría de animales (*Drosophila* 3.5 μ).

El número cromosómico también es variable en la naturaleza, encontrándose especies con un bajo número cromosómico: *Mymercia pilosula* (Formicidae) 2n=2, especies con un número elevado de cromosomas como *Tympanoctomys barrerae* (Octodontidae) 2n=102 y la especie con el mayor número de cromosomas es *Aulacantha scolymantha* (Aulacanthidae) 2n= 1600.

Las investigaciones a nivel citogenético permiten posteriormente realizar estudios evolutivos, identificar el banco de genes y realizar el mejoramiento genético del género o especie en interés (Siles, 1996; Gonzáles, 1998).

Los datos citogenéticos pueden ser utilizados para la identificación de eventuales arreglos cromosómicos dentro de una misma especie (Mandrioli *et al.*, 1999) por lo tanto proveernos de información sobre su evolución.

Siendo la citogenética una herramienta que permite identificar el banco de genes e indagar los aspectos evolutivos de una especie, ha sido utilizada durante años en diversos seres vivos.

En los insectos, estos estudios han estado orientados a conocer el número de cromosomas y el comportamiento de los mismos, así se tiene que *Callimenus macrogaster* perteneciente al orden Orthoptera, presenta $2n=23$ cromosomas, con esta información y gracias al uso de técnicas de bandeo C se pudo conocer la relación existente entre *C. macrogaster* y otras especies del género *Callimenus* (Turkoglu *et al.*, 2006).

Por otro lado en este tipo de investigaciones se ha analizado también la distribución y el número de las Regiones Organizadoras del Nucleolo (NORs), considerándosele un buen marcador para las especies en estudio. Así dentro del género *Schistocerca*, se observó que *S. flavofasciata* y *S. pallens*, coinciden en presentar como número diploide $2n=23X$ en machos y $2n=24XX$ en hembras, ambas especies tienen cariotipos similares, sin embargo muestran diferencias en el número y la distribución de los NORs (De Souza & Franklin de Melo, 2007).

Los Hemípteros presentan un tipo peculiar de cromosomas, son los denominados holocéntricos, los cuales se caracterizan por no tener un centrómero localizado. En este grupo se encuentran *Cimex rotundatus* con $2n= 28$ cromosomas (Darlington & La Cour, 1969), *Belostoma sp.* presenta $2n=16$ (Papeschi, 1996).

En la subfamilia Triatominae (vectores del parásito *Trypanosoma cruzi*), las investigaciones a nivel cromosómico han permitido aclarar aspectos evolutivos y sistemáticos, ellos han revelado que este es un grupo homogéneo con $2n=21-25$ y que las variaciones en el número de cromosomas se debe principalmente a los distintos sistemas sexuales debido a la naturaleza holocéntrica de sus cromosomas (Pérez *et al.*, 1997, 2003).

Los estudios cromosómicos han permitido identificar hibridaciones en la familia Pentatomidae, tal es el caso de *Eurydema pulchrum* y *Bagrada cruciferarum* ambas especies tienen $2n=14$, y todos sus cromosomas son de tipo holocéntrico (Harbhajan *et al.*, 2006).

2.2 Los Cromosomas Holocéntricos

2.2.1 Características de los cromosomas holocéntricos

El centrómero es la región de DNA de los cromosomas eucarióticos que determina la formación del cinetocoro y la unión de las cromátidas hermanas a éste. La interacción del centrómero con los microtúbulos del huso asegura la segregación de las cromátidas en la mitosis y de los cromosomas homólogos durante la meiosis.

La elongación de las fibras del huso están estrechamente relacionadas con el movimiento del cinetocoro, así especies con mayor incremento en la longitud del huso muestran mayor movimiento del cinetocoro mientras especies en las que la elongación del huso es corta tienen poco movimiento en el cinetocoro (Hughes-Schrader, 1943).

El origen del centrómero no es muy comprendido, Villasante *et al.* (2007) proponen que los centrómeros se originan a partir de los telómeros lo cual indica que los centrómeros primero fueron de tipo telocéntrico y luego se desarrollaron los otros tipos incluyendo el holocéntrico, pero este es un proceso que aún no está del todo aclarado.

En los cromosomas holocéntricos no se visualiza el centrómero localizado, sino es difuso y las fibras del huso se conectan a lo largo de todo el cromosoma a diferencia de los cromosomas monocéntricos donde el huso se ancla en una región específica del cromosoma y cuando hay fragmentos de cromosoma, inducidos por radiación (rayos x), estos se mueven desde una generación celular hasta la siguiente y no se pierde ninguno, entonces si cada fragmento tiene la capacidad de migrar hacia los polos es indicador de que la actividad cinetocórica es a lo largo del cromosoma (Nokkala *et al.*, 2002). Los cromosomas llegan a ser unidos a las fibras del huso en su longitud entera y durante la anafase de la mitosis ellos ordinariamente se mueven a cada polo siguiendo su eje longitudinal paralelo a la placa metafásica (Muramoto, 1985).

Por otro lado, ya que el cinetocoro no está localizado las cuatro cromátidas no podrán ser segregadas de dos en dos en la primera anafase meiótica, lo que quiere decir que no habrá división centromérica como en una meiosis normal, en respuesta a ello como adaptación a la naturaleza holocéntrica la secuencia meiótica se invierte, lo cual asegura una segregación exacta del material hereditario (Chandra, 1962), así la primera división será de tipo ecuacional, mientras que la segunda división será de tipo reduccional.

Fenómenos característicos de los cromosomas holocéntricos (King, 1958):

1. En la profase tardía se da la separación completa de las cromátidas hermanas de cada cromosoma.
2. No existe constricción primaria.
3. Las cromátidas se separan paralelamente en la anafase.

Los cromosomas holocéntricos presentan algunas características comunes durante la mitosis (John, 1990 citado por Pérez *et al.*, 1997):

1. No presentan constricción primaria aunque se observa las estructuras cinetocóricas que permitirán el movimiento.
2. En la metafase cada cromosoma es orientado con su eje longitudinal paralelo al plano ecuatorial.
3. La unión de las fibras del huso mitótico es a lo largo de la longitud de las cromátidas.
4. En la anafase las cromátidas se mueven hacia los polos con su eje longitudinal paralelo al plano ecuatorial.

Las características observadas por King y John, también han sido encontradas por Nokkala *et al.* (2002) y por Aquino & Bárcenas (2002).

A nivel molecular el cromosoma holocéntrico ha sido estudiado en *Caenorhabditis elegans*, cuyo genoma es similar al humano (Dernburg, 2001). Howe *et al.* (2001) encontraron una proteína altamente conservada en su cinetocoro, HIM-10, que media la unión de los cromosomas al huso y cuya ausencia repercute en la no disyunción de las cromátidas.

También ha sido estudiada la proteína del huso acromático, la KLP-19, cuya ausencia genera aberraciones cromosómicas que se traducen en puentes anafásicos y el incorrecto alineamiento de los cromosomas (Powers *et al.*, 2004). HCP-4 también es requerida para la segregación de las cromátidas hermanas en *C. elegans* y su ausencia evita que las cromátidas se unan a los microtúbulos del huso (Moore & Roth, 2001).

2.2.2 Los cromosomas holocéntricos en los insectos

Los cromosomas holocéntricos están presente en una amplia gama de insectos de diferentes ordenes incluyendo: Hemíptera, Coleóptera, Dermáptera, Lepidóptera, Odonata y Orthoptera, ello sugiere estudiar la evolución de los cromosomas en este grupo tan variado.

Las especies con cromosomas holocéntricos de acuerdo a Muramoto (1985) son:

Coleóptera → *Aulacophora femoralis*.

Dermáptera → *Forficula mikado*.

Hemíptera → *Cicadella viridis*.

Lygaeus equestris

Eurydema rugosa

Plautia stali

Schizaphis graminun, $2n = 8$ (Mandrioli *et al.*, 1999).

Orthoptera → *Oxya yezoensis*.

Lepidóptera → *Abraxas* sp. y *Bombyx mori*, $2n = 56$ (Yoshido *et al.*, 2005).

En la mayoría de insectos del orden Odonata se han encontrado que los cromosomas son de tipo monocéntrico es decir con centrómero localizado, siendo así bastante común en este grupo los del tipo metacéntrico, sin embargo la especie *Somatochlora metallica* ha sido de particular interés porque presenta cromosomas holocéntricos (Nokkala *et al.*, 2002), este hecho nos motiva a investigar a fondo cuales han sido los mecanismos evolutivos que han llevado a esta transición de la naturaleza holocéntrica y monocéntrica dentro de un mismo clado y conocer los arreglos que se han dado a nivel cromosómico y explicar así mismo como ha repercutido en la variabilidad del grupo.

Con respecto a la superfamilia Coccoidea, se sabe que *Pseudococcus nipae* presenta $2n=10$ cromosomas, todos de tipo holocéntrico y de pequeña longitud (Schrader, 1921).

Dactylopiidae al igual que muchas familias de los Coccoidea también se caracterizan por la naturaleza holocéntrica de sus cromosomas (Aquino & Bárcenas, 2002).

En la familia Dactylopiidae se ha encontrado que tres especies mexicanas, *Dactylopius confusus* y dos especies de *Dactylopius spp.* (no identificadas) presentan como número diploide $2n=10$, coincidiendo con Schrader (1921) en encontrar un bajo número cromosómico en cóccidos y todos de naturaleza holocéntrica, así mismo se ha reportado que el número diploide de *D. coccus* es de $2n=16$, donde se hipotetiza que los tres pares adicionales que tiene esta última especie en comparación con las anteriores se debe ha un posible fraccionamiento del primer par de cromosomas (Aquino, 1991).

2.2.3 Fusión y fisión de los cromosomas holocéntricos

Los procesos de fusión y fisión en los cromosomas holocéntricos son los responsables de la variación cariotípica dentro de un mismo género, así lo demuestra Cook (2000) para justificar la alta variación en el número cromosómico del género *Apiomorpha* (Hemíptera: Coccoidea: Eriococcidae), donde el número cromosómico más bajo fue atribuido a *A. baeuerleni* ($2n=4$) y el más elevado a *A. macqueeni* ($2n=192$) y entre ambos existen especies con diferentes números diploides $2n= 10,18,28,32,56,80,144$,etc y casualmente los cromosomas de las especies con

elevado número son de pequeño tamaño y las especies que presentaron bajo número diploide tienen cromosomas bastante grandes.

Lo encontrado en el género *Apiomorpha*, es bastante similar a lo encontrado por Aquino (1991) en el género *Dactylopius*, en el cual reporta que las especies silvestres de este género *D. confusus* y otras dos especies no determinadas tienen como número diploide $2n=10$, con un par de cromosomas bastante grandes y los cuatro pares restantes pequeños mientras que *D. coccus* presenta $2n=16$ cromosomas todos pequeños.

Estos dos eventos pueden explicarse por los procesos de fusión-fisión de los cromosomas holocéntricos lo cual juega un rol importante en la evolución.

La naturaleza holocéntrica en los cromosomas ha sido también observada en algas como: *Cosmarium botrytis*, *Closterium acerosum*, *Hyalotheca dissiliens*, entre otros, en las cuales King (1958) encuentra diferentes números cromosómicos en clones de una misma especie, así para *Netrium digitus* reporta una variedad con $2n=56$, otra $2n=86$ y una última $2n=296$ cromosomas y afirma que este número es variable debido a la naturaleza holocéntrica de los cromosomas donde es usual que se den procesos de fusión y fisión.

Las técnicas moleculares son una herramienta muy útil para detectar fusiones entre cromosomas, tal es el caso de *Arabidopsis mutants*, esta planta tiene cromosomas monocéntricos (centrómero localizado) pero la peculiaridad de este organismo es que es deficiente en el gen de la telomerasa reversa transcripatasa (TERT). Cuando un cromosoma se parte sus regiones terminales tienden a fusionarse debido a que la célula opta por reparar este daño mediante la recombinación de terminaciones entre homólogos o no homólogos que se juntan, el resultado es que en las subsecuentes mitosis se observan puentes anafásicos. Los telómeros de *A. mutants* en ausencia de TERT pasan por este proceso de reparación, dichas uniones fueron evidenciadas por Mokros *et al.* (2006) quienes utilizaron BAC-FISH bicolor, ésta técnica resultaría de gran ayuda para el análisis de cromosomas holocéntricos donde los procesos de fusión y fisión son constantes.

2.3 La evolución en los cóccidos debido a los cromosomas holocéntricos

Así como existen modificaciones a nivel fenotípico, a lo largo del proceso evolutivo se han dado modificaciones a nivel cromosómico, particularmente porque poseen cromosomas de tipo holocéntrico. Brown (1966), Nur (1982) y Aquino (1991), demuestran que la naturaleza holocéntrica de los cromosomas ha conducido a este grupo a una evolución poco usual, donde se encuentran como causantes de ello los procesos de fraccionamiento y fusión de los cromosomas, así mismo en el particular comportamiento que van a tener los cromosomas en la meiosis donde la primera división va a ser ecuacional y la segunda reduccional, es decir, la secuencia se invierte, ya que como explica Chandra (1962), en la primera división meiótica debido a la naturaleza holocéntrica de los cromosomas ellos van a comportarse como en la mitosis donde las cromátidas migrarán a los polos en la anafase I y no los cromosomas, es decir, las cromátidas se van a “auto-orientar” para luego reasociarse y en la anafase II las cromátidas homólogas se separarán como sucedería en la anafase I normal, por lo tanto la segunda división es reduccional. (Chandra, 1962; Nur, 1982; Aquino, 1991).

La inversión de la secuencia meiótica va a permitir que se eliminen cromosomas de origen paterno, los cuales dependiendo de en que momento se eliminan o inactivan van a conocerse como sistemas: Lecanoide, Comstockiella o Diaspididae.

Tanto la naturaleza holocéntrica de los cromosomas como la secuencia meiótica inversa pueden ser los responsables de la diversificación de las especies de cochinilla, a través de fisiones y fusiones de los cromosomas (Aquino & Bárcenas, 2002).

2.4 Heterocromatinización y determinación del Sexo

2.4.1 La Heterocromatina

Una región específica dentro del cromosoma (centrómero) es responsable del movimiento durante la separación de éstos hacia los polos. Esta región tiene una tinción diferencial al resto del cromosoma, por tanto se reconocen dos clases de material cromosómico: eucromatina y

heterocromatina. La eucromatina tiene alta tasa de mutación, no presenta alociclia y es de rápida replicación.

La heterocromatina posee secuencias repetidas, no expresa todos sus genes y presenta alociclia, proceso por el cual una misma región heterocromática puede aparecer heteropícnóticamente positivo o negativo dependiendo del estadio celular. La heterocromatina puede ser de dos tipos: constitutiva y facultativa.

- ✓ H. Constitutiva: aquella que conserva su estado de condensación en todas las células y en todo momento y por lo tanto corresponde a DNA permanentemente silencioso y consta en general de secuencias altamente repetitivas, por lo tanto es heteropícnóticamente constante.
- ✓ H. Facultativa: es cromatina específicamente inactiva durante ciertas fases de la vida de un organismo (Karp, 1998) y varía heteropícnóticamente (Lacadena, 1996).

Las zonas heterocromáticas de un cromosoma van a ser ubicadas exactamente en la misma región de su homólogo.

2.4.2 La heterocromatinización y la determinación del sexo en los cóccidos

Al estudiar los cromosomas de los cóccidos no se aprecian cromosomas sexuales, ambos, machos y hembras se desarrollan a partir de huevos fertilizados, pero en los embriones de machos los cromosomas de origen paterno llegan a heterocromatinizarse y se inactivan genéticamente o se eliminan (Nur, 1982, 1990).

El genoma paterno no es activo en los machos, Brown & Nelson-Res (1961) lo comprobaron al exponer a radiación a cóccidos machos los cuales luego se cruzaron con hembras no irradiadas, lo que dio como resultado que casi todos los machos sobrevivieran en contraste con las hembras donde casi todas murieron, por lo tanto se vio inactividad genética de los cromosomas paternos en machos, en los cuales los cromosomas de origen paterno se heterocromatinizan en la

embriogénesis para hacerse no funcionales o destruirse, mientras que en la hembras descendientes fue perjudicial ya que en ellas si hay actividad genética de los cromosomas paternos y todos estos son eucromáticos.

La heterocromatinización en los cóccidos parece ser un mecanismo mediante el cual parte de un cromosoma o todo el cromosoma o varios cromosomas van a llegar a ser genéticamente inactivos durante el desarrollo del individuo (Brown & Nur, 1964).

Estos autores explican este proceso afirmando que en la primera división inmediatamente después de la fertilización los cromosomas de los embriones aparecen eucromáticos, poco después en el estado de blástula la mitad de los cromosomas llegan a ser heterocromáticos en aquellos embriones que están destinados a ser machos, mientras que en las hembras todo el juego de cromosomas se mantiene eucromático.

Esta heterocromatinización fue observada por primera vez por Franz Schrader en 1921, en el Pseudococcidae *Pseudococcus nipae*, donde encontró cinco cromosomas eucromáticos (E) y cinco heterocromáticos (H). Sobre este grupo heterocromático se sabe que son de origen paterno, como se mencionó antes y además que el juego heterocromático en los machos es genéticamente inerte (Schrader, 1921), lo que significa que a pesar de que el número de cromosomas en machos es diploide, son virtual o fisiológicamente haploides. En los embriones destinados a ser machos los cromosomas heterocromáticos se mantienen juntos en interfase y en esta etapa están mas condensados que en profase (Brown, 1966).

El cóccido *Phenacoccus acericola* tiene $2n=12$ cromosomas de naturaleza holocéntrica y los procesos de heterocromatinización son típicos en este género, así se encontró que los machos de esta especie durante la metafase I de la meiosis, que es similar a la mitosis, presentan dos juegos de cromosomas uno que se tiñe densamente y forma un anillo y otro que tiene una tinción más baja y no se tiende a agrupar (Hughes-Schrader, 1935).

La heterocromatinización del juego paterno de cromosomas en la embriogénesis ha sido estudiado también en el género *Parlatoria* ($2n=8$). La heterocromatinización se da con el fin de destruir estos cromosomas durante la espermatogénesis, lo peculiar de este género es que antes de iniciada la meiosis uno de los cromosomas del juego paterno es destruido y sólo entrarán a

meiosis el juego materno de cromosomas y los tres restantes paternos que finalmente también van a ser destruidos (Kitchin, 1975).

La heterocromatina de los cóccidos es conocida por ser genéticamente inactiva sin embargo se le atribuyen dos tipos de actividad residual, la primera es un requerimiento de un volumen normal de heterocromatina y la segunda radica en que al realizar un cruce el juego paterno de los machos no puede ser sustituido por otro (Berlowitz, 1964).

Nur (1990) demostró que existe una relación íntima entre los cromosomas heterocromáticos (H) y los eucromáticos (E), como se explica a continuación: se cruzaron machos de *Pseudococcus calceolariae* en los que la serosa (membrana embrionaria) de los embriones machos mantenían el genoma paterno heterocromático (H) con hembras de *P. affinis* donde el genoma paterno es eucromático y ello resultó en híbridos que tenían la serosa eucromática, lo cual muestra que existe una activación de los homólogos H, por sus homólogos E y que a lo largo del desarrollo de los machos, el juego heterocromático se divide sincrónicamente con el juego eucromático. Además en la metafase ambos juegos no son distinguibles y esta etapa se observa igual en hembras y machos.

En *Dactylopius coccus* los machos a nivel citogenético se caracterizan por la heterocromatinización de los cromosomas paternos, mientras los de origen materno permanecen eucromáticos (Aquino & Bárcenas, 2002).

Reversión de H a E:

En algunos tejidos de cóccidos machos se observó la pérdida de los cromosomas heterocromáticos H, debido a un proceso de reversión de la heterocromatinización y por tanto el retorno de los cromosomas H a un estado eucromático E. Este proceso inverso varía de especie a especie y el tiempo que tarde varía de tejido a tejido (Nur, 1967).

Los cromosomas heterocromáticos tienen la capacidad de revertir su condición a eucromáticos (Brown, 1966) lo cual también ha sido observado por Nur (1990) en algunos órganos y tejidos

como los túbulos de Malpighi, las glándulas salivales y la serosa (membrana embrionaria) de *Pseudococcus spp.*

Actualmente con el desarrollo de muchas técnicas moleculares es posible explicar a nivel de proteínas o con marcadores moleculares los pasos exactos en los diversos procesos biológicos. Así Bongiorno *et al.* (2001) investigaron la actividad de la proteína no histona HP-1 en el proceso de heterocromatinización, la cual es una proteína cromosómica altamente conservada y se reportó por primera vez en *Drosophila melanogaster* en la heterocromatina de sus cromosomas politénicos.

Con el uso de anticuerpos monoclonales se evidenció que HP-1 está presente en *Planococcus citri*, y está preferencialmente asociada con regiones específicas de los cromosomas heterocromáticos de los machos y se le observó dispersa a lo largo del cromosoma con un patrón reproducible. Estos resultados indican un rol importante de la HP-1 en el proceso de heterocromatinización.

2.5 Poliploidía

Se dice que un individuo es diploide cuando su dotación autosómica normal está compuesta por dos juegos idénticos de x cromosomas cada uno, de forma que dichos x cromosomas son todos diferentes entre si tales que no pueden reagruparse en grupos inferiores x_1, x_2, \dots, x_n ($x_1 + x_2 + \dots + x_n = x$). El conjunto de los x cromosomas es el genomio y se llama número básico al número de cromosomas que lo conforman.

Si la dotación de un individuo está compuesta por más de dos genomios o juegos completos de cromosomas se dice que es un poliploide (Lacadena, 1996).

La poliploidía puede ser generada por endoreduplicación, este proceso es la ocurrencia de dos o más rondas sucesivas de replicación cromosómica sin pasar por ningún periodo mitótico intermedio ocasionando que la célula pase de $2n$ a $4n$.

Nur (1989), menciona que la poliploidía es un posible mecanismo para el aumento en el número cromosómico. Así existen especies dentro de un mismo género con $2n=8$, $2n=16$, $2n=18$ y se

cree que $2n=16$ ha derivado o se origina de un doble juego de $2n=8$ y que en el caso de $2n=18$ este se formó a partir de $2n=16$ y los 2 cromosomas anexos provienen de la fragmentación de algún cromosoma y los posteriores arreglos. Una alternativa para explicar mejor esto es que $2n=16$ y $2n=18$ fueron derivados de $2n=8$ mediante una serie de pasos (8, 10, 12, 14, 16, 18). Pero la ausencia de dicho grupos, 12, 14, tiende a favor de la hipótesis de la poliploidización.

Otro dato que confirma el origen poliploide en una especie es la longitud total del complemento (LTC) cromosómico, así por ejemplo *Diaspis echinocacti* con $2n=16$ y LTC = 65,1 +/- 0,6 μm y *Grenaspis decurvata* con $2n=8$ tiene LTC = 31.1 +/- 1.2 μm . Estas especies de géneros diferentes son de la familia Diaspidiidae y la LTC se sabe que está relacionado con el contenido de DNA de los cromosomas. Por tanto, este dato sugiere que *D. echinocacti* es tetraploide (Nur, 1989).

Hughes-Schrader (1948), citado por Aquino (1991), señala que la poliploidía es un fenómeno común en los huevos de cóccidos y su tarea es participar en el desarrollo de los embriones.

2.6 Micronúcleos

Los micronúcleos son fragmentos de cromosoma o cromosomas completos que quedan fuera del núcleo en mitosis (Schmid, 1975 citado por Castañeda, 2008). El principio de su formación es en la anafase, donde cualquier fragmento cromosómico que no posea centrómero no podrá integrarse al núcleo pues carece del elemento necesario para unirse al huso. Calvert *et al.*, 1998 citado por Castro *et al.*, 2004 señalan que su formación también está relacionada con el daño a las proteínas que constituyen el huso mitótico las cuales no estarán en capacidad de unirse a uno o más centrómeros dejando cromosomas o restos de este a un lado.

Los elementos rezagados quedan integrados en el citoplasma de las células hijas y son más pequeños que el núcleo principal de ahí el nombre de micronúcleos MN. Este fenómeno se traduce como pérdida de DNA, lo que puede inducir mutaciones de células somáticas.

Se ha atribuido la presencia de micronúcleos a metales pesados por lo que cuando las células de un organismo lo presentan indicaría contaminación en el ambiente, así por ejemplo Prieto *et al.* (2006-a) encuentran que la presencia de arsénico en el agua ha provocado la formación de

micronúcleos en las branquias de *Danio rerio* (pez cebra), que se incrementa cuando la concentración de arsénico aumenta. El arsénico también ha inducido la formación de micronúcleos en *Vicia faba* (Prieto *et al.*, 2006-b) por lo tanto estos estudios son de gran importancia para el rescate de ecosistemas que han sido impactados por metales pesados u otros agentes contaminantes.

Domínguez *et al.* (2006) encontraron que el dióxido de carbono, amoníaco, metanol y xileno inducen lesiones predominantemente citotóxicas incluyendo la formación de micronúcleos en células bucoepiteliales humanas y que estos procesos son independientes de la edad o los hábitos de cada persona, en este mismo tipo celular se ha reportado la presencia de micronúcleos en mujeres que ocupacionalmente se exponen a plaguicidas (Castro *et al.*, 2004).

Los micronúcleos influyen en la tasa de división celular, es decir en el índice mitótico de modo que mientras el número de micronúcleos aumenta el índice mitótico disminuye (Hick *et al.*, 2007). La disminución del índice mitótico por la presencia de micronúcleos también ha sido encontrada en las branquias del mejillón *Mytilus californianus* de las aguas del mar de Baja California donde hubo derrame de petróleo (Márquez, 2005).

Liu *et al.*, 1994 han demostrado los efectos que tiene el plomo en altas concentraciones en el desarrollo de *Allium cepa*. Encontraron células con micronúcleos y aberraciones en la anafase donde se forman puentes entre los grupos de cromosomas que migran hacia los polos y núcleos con forma irregular. La presencia de puentes anafásicos debido a los micronúcleos ha sido igualmente encontrado en *Lens culinaris* debido a efectos citotóxicos por cadmio (Kiran & Sahin, 2006).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales:

3.1.1 Material biológico:

Muestras de hembras grávidas de *Dactylopius coccus*, colectadas en el distrito de San Bartolomé, Huarochirí, Lima.

Latitud Sur: 11° 54' 26"

Longitud Oeste: 76° 31' 28"

Altura: 1584 msnm

3.1.2 Material químico:

- Agua destilada
- Ácido clorhídrico **HCl 0.25N**
- Orceína lacto-acética **OLA 2%**
- Alcohol 70°
- Bálsamo de Canadá
- Esmalte de uñas

3.1.3 Material de vidrio:

- Láminas portaobjetos
- Láminas cubreobjetos
- Placas Petri
- Beakers
- Bagueta
- Frascos de vidrio
- Pipetas de 1ml

3.1.4 Equipos e instrumentos:

- GPS: Etrex-Garmin
- Microscopio compuesto Carl Zeiss
- Microscopio estereoscopio
- Refrigeradora
- Cámara fotográfica digital
- Cera o parafina
- Pinzas relojero
- Tijera de punta fina
- Alfileres
- Pincel
- Compás
- Guantes
- Papel lente
- Papel toalla
- Papel canson
- Calculadora
- Lápiz

3.2 Metodología

3.2.1 Preparaciones Citológicas

Los ejemplares de *Dactylopius coccus* fueron colectados en el distrito de San Bartolomé, Provincia de Huarochirí, en el Departamento de Lima. (Ver anexo), éstos encontraron parasitando el tallo, cladodios y frutos de una población natural de cactáceas, se les separó de las mismas con la ayuda de una espátula cuidando no aplastarlas y manteniendo intacta su coccerina. Se les depositó en un frasco y se les trasladó a la ciudad de Lima.

Para las preparaciones citológicas se siguió el protocolo dado por Aquino (1991), con algunas modificaciones.

Se colocaron los ejemplares en la parte superior del refrigerador (4°C) durante veinticuatro horas. Se fijaron las muestras en alcohol etílico al 70% durante 15 minutos, mientras con la ayuda de un pincel se retiraba cuidadosamente la coccerina. Los ejemplares fueron sometidos a una hidrólisis lenta, pasándolos a una placa petri con HCl 0.25N y se les dejó reposar por veinticuatro horas. Se tomó un individuo y se le colocó en una placa petri con cera, bajo el microscopio estereoscopio se sujetó al insecto con una pinza relojero y manteniéndolo en posición dorsal se inició la disección por la región anterior, cuidando en lo posible no dañar los órganos internos del individuo.

Se utilizaron alfileres para sujetar la cutícula sobre la cera y así tener expuesto el sistema reproductor. Se extrajeron los embriones separándoles cuidadosamente de los ovarios y oviductos y a estos se les colocó en una placa petri con agua destilada por espacio de una hora para hipotonizarlos.

Se pusieron tres embriones en cada laminilla siliconizada y se les cubrió con una gota de orceína lacto-acética al 2 %, se dejó colorear durante 30 minutos. Se cubrió cada laminilla con una lámina, evitando la formación de burbujas se realizó el squash (aplastado) a cada una de las láminas- laminillas y finalmente se cerraron los bordes con esmalte transparente.

Se observaron las láminas preparadas bajo un microscopio Zeiss y se fotografiaron las placas metafásicas, aquellas que nos permitan contar el número cromosómico de la especie en estudio.

Para establecer el cariotipo se trabajó con cada una de las fotografías de las mejores placas metafásicas, las cuales se copiaron a lápiz sobre papel canson para individualizar los cromosomas en caso hubiese sobreposición. Para establecer la longitud de los cromosomas se utilizó un lente ocular micrométrico y se midieron sólo las placas en metafase porque ésta es la fase donde los cromosomas alcanzan su máximo grado de condensación.

Se midió la longitud total de cada cromosoma (C) y se calculó la longitud relativa (Lr), que se obtiene de la relación porcentual entre la longitud total (C) y la suma de las longitudes totales de los cromosomas del complemento haploide.

$$Lr = C \times 100 / \sum Cn$$

Los cromosomas se enumeraron al azar. Con los datos anteriores y considerando su forma se establecieron los pares de homólogos. De esta forma se estableció el cariotipo de *D. coccus*.

Para analizar los demás aspectos citogenéticos, se fotografiaron las otras fases del ciclo celular: células en interfase, en profase, anafase y telofase.

3.2.2 Método estadístico

Para conocer cual es el número apropiado de placas mínimas para conocer cuantos cromosomas hay por célula, se calculó el tamaño de muestra sugerido por Wayne (1998), bajo la siguiente fórmula:

$$N = s^2 \times Z_{\alpha/2} / e^2$$

Donde:

s^2 : varianza de la muestra.

$Z_{\alpha/2}$: es el grado de confiabilidad, en la presente investigación se trabajo con un nivel de confianza del 95%.

e^2 : en el presente trabajo se admitió como error máximo 0,05 unidades.

Para el cálculo de la varianza muestral, se analizaron inicialmente 30 placas. Tomando como única variable el número de cromosomas por placa.

Cuadro 01

N° de placa	N° de cromosomas
1	16
2	16
3	16
4	16
5	16
6	16
7	16
8	16
9	16
10	14
11	16
12	16
13	16
14	16
15	16
16	16
17	16
18	16
19	16
20	16
21	16
22	16
23	16
24	16
25	15
26	16
27	16
28	16
29	16
30	16

✓ **Cálculo de la varianza muestral:**

$$s^2 = \sum (x-u)^2 / n-1$$

Donde:

u = E = promedio de las placas observadas.

u = 15.9

$$s^2 = [(16-15,9)^2 + \dots + (14-15,9)^2 + (16-15,9)^2] / 29$$

$$s^2 = [28 \times (0,01) + 3,61 + 0,81] / 29$$

$$s^2 = 0,162$$

✓ **Cálculo del tamaño de muestra:**

$$N = s^2 \times Z_{\alpha/2} / e^2$$

$Z_{\alpha/2}$ = +/- 1.96 (de acuerdo a tabla)

e = error máximo admitido, en este caso 0,05.

Se obtuvo entonces:

$$N = 1,96^2 \times 0,162 / 0,05^2$$

$$N = 40,33$$

Por lo tanto, el número mínimo de placas para determinar el número de cromosomas en las células de *Dactylopius coccus* es 40.

4. RESULTADOS°

4.1 Sobre la Metodología

Congelar los ejemplares de *Dactylopius coccus* facilita su posterior disección ya que el cuerpo de la hembra grávida se torna más compacto y esto permite una mejor sujeción de la misma, pero la técnica de congelar se usa en realidad con el objetivo de inhibir el ensamblaje de tubulina y por ende la formación de los microtúbulos del huso, lo cual se traduce finalmente en obtener un número mayor de placas metafásicas.

Esta técnica es muy apropiada ya que evita el uso de drogas como la colchicina o la hidroxiquinolina las cuales aumentan la concentración de los cromosomas reduciendo aún más su tamaño, y en el presente estudio esto no sería nada favorable porque los cromosomas naturalmente son ya bastante pequeños.

Para fijar los tejidos de *D. coccus* se obtuvo que el alcohol etílico 70% es el ideal, siendo apropiado para preservar los tejidos de cualquier insecto, pero además ya que dicha solución es una sustancia polar, fue de utilidad para retirar la coccerina (cera blanquecina que cubre su cuerpo), lo cual es de mucha importancia primero porque nos permite ver las regiones del cuerpo de la hembra de la cochinilla: cabeza, tórax y su amplio abdomen, así mismo sus tres pequeños pares de patas y diferenciar por tanto la zona anterior de la posterior y el lado ventral y dorsal que antes era imposible apreciar.

El librar a la cochinilla de su cera nos ayuda además a darle permeabilidad al tegumento, ello es necesario para el siguiente paso.

La hidrólisis, tanto de órganos, tejidos y células se realizó usando una solución de HCl 0.25N, es importante que la hidrólisis sea lenta porque una concentración elevada de ácido provocará la desintegración del exoesqueleto de las cochinillas en formación, lo que finalmente se observa como suciedad en las láminas a analizar (Fig.74). En este paso se debe tener en cuenta que el carmín es un indicador de pH que se torna rojo en un medio ácido y tiende a fucsia en un medio alcalino. En la metodología se determinó que la hidrólisis debe ser durante 24 h, sin embargo en algunas cochinillas, en especial las más jóvenes, este tiempo es menor, quizá porque las

cochinillas viejas tengan el tegumento más grueso y por lo tanto menos permeable que una cochinilla joven. Se puede determinar que la lisis ha sido excesiva cuando todo el líquido que rodea a la cochinilla se ha tornado rojo, en estas cochinillas el material tisular de los embriones estará destrozado y no se encontrarán células enteras. Lo ideal es que el ácido que rodea a la hembra no llegue al rojo (Fig.75 y 76).

La disección se realizó de forma anterodorsal y no posteroventral ya que ello asegurará no dañar el sistema reproductor que contiene los embriones, los cuales luego van a ser depositados en una nueva placa Petri.

Luego de haber sometido a hidrólisis lenta al ejemplar, es importante lavar los restos de HCl presente en el medio porque estos interfieren en la coloración final. Además se deben hipotonizar las células del embrión para una mejor visualización de su contenido, para ello se utilizó en un inicio diferentes concentraciones de solución salina NaCl desde un 0.9% hasta un 0.1%, observando que los mejores resultados se obtuvieron con concentraciones bajas o nulas de sal. Se decidió finalmente trabajar con agua destilada pura. El agua destilada permitió por ósmosis que las células aumenten de tamaño y facilitó la tinción con la orceína lacto- acética.

Para la determinación del cariotipo se seleccionaron las placas metafásicas bajo los siguientes criterios:

- ✓ Las células deben de estar completas, ya que de lo contrario podríamos contabilizar un número de cromosomas menor al real.
- ✓ Las células deben estar en monocapa, ya que las sobreposiciones de capas celulares dificultarán la individualización objetiva de los cromosomas.
- ✓ Las células deben de estar lo suficientemente hipotonizadas para una mejor visualización de cada cromosoma.
- ✓ El citoplasma de cada célula debe de estar limpio, de modo tal que lo único que resalte en la célula sean los cromosomas.

- ✓ Los cromosomas en lo posible deben de estar separados entre sí, es decir, se trabajó sólo con las placas metafásicas polares en la que la distribución de los cromosomas es en toda la célula y no en el plano ecuatorial.

Se encontró que la hora óptima donde es posible visualizar la mayor cantidad de metafases es entre las 10 y las 11 horas.

Para la visualización y posterior análisis de los aspectos citogenéticos relevantes se seleccionaron preferencialmente las células bien hipotonizadas.

Determinación del Cariotipo de *D. coccus*

En los cromosomas de *D. coccus*, no se observó la presencia de constricción primaria, por lo que se determinó que son de tipo holocéntrico y al elaborar el cariotipo no se consideró la posición del centrómero, ni los índices de brazos; tan sólo la longitud total y la forma de condensación de cada uno de ellos.

En el presente trabajo se buscó primero establecer el número cromosómico para lo cual se analizaron 72 (Nº mayor al requerido estadísticamente) núcleos en estado profásico tardío y metafásico, provenientes de 37 embriones. Se observaron células con condensación diferencial de la cromatina y células que tienen condensación pareja en todos los cromosomas, los primeros corresponden a embriones machos como se explicará más adelante y los segundos a embriones hembra. Ambas células fueron incluidas en el análisis porque en ellas se encontraron el mismo número de cromosomas. El número cromosómico de esta especie es $2n=16$. Se seleccionaron las mejores veinte placas, aquellas donde los cromosomas no estuvieron fusionados entre sí y en esta selección se dio preferencia a las placas en proceso metafásico ya que es en la metafase donde los cromosomas adquieren su máximo grado de condensación. (Fig. 06-46).

Se midió minuciosamente cada cromosoma. En general las diferencias en su longitud fueron pequeñas pero muy importantes para determinar cuales eran los pares de homólogos, así con la mayor precisión posible se establecieron dichos pares y posteriormente se calculó la longitud

relativa (ver anexos). Se encontraron variaciones en el tamaño por lo que se determinó una longitud promedio para cada par homólogo, como se muestra a continuación:

Cuadro 02

Estos datos son el consenso de 20 placas metafásicas. (Ver anexos)

Cromosomas	Longitud mínima (μm)	Longitud máxima (μm)	Longitud promedio (μm)	Longitud relativa (%)
1^{er} par	0,94	2,59	1,64	18,37
2^{do} par	0,86	2,51	1,44	16,13
3^{ro} par	0,765	1,75	1,26	14,04
4^{to} par	0,75	1,72	1,16	12,96
5^{to} par	0,715	1,63	1,03	11,46
6^{to} par	0,70	1,50	0,91	10,16
7^{mo} par	0,65	1,47	0,81	9,07
8^{vo} par	0,56	1,39	0,70	7,81

En el estado más condensado, conocido como una metafase típica (Placa N° 04) la longitud de los cromosomas fluctúa entre 0,6 μm y 1,5 μm . Y en el estado menos comprimido, lo que es conocido como una metafase inicial o prometafase tardía (Placa N° 20), esta longitud fluctúa entre 0,97 μm y 2,59 μm .

El cariotipo (Fig. 01) está formado por ocho pares cromosómicos y la longitud promedio, máxima (estado de baja condensación) y mínima (estado de alta condensación) son mostrados en el cuadro 02. El promedio de longitud de cada par homólogo es en todos los casos, más cercano a la longitud mínima, lo que indicaría que esta diferencia en tamaño ha sido influenciada por ciertas placas como se discutirá más adelante.

Es importante mencionar que se observaron fibras de cromatina entre los cromosomas, los cuales han sido señalados en las representaciones esquemáticas con flechas rojas. (Ver anexos).

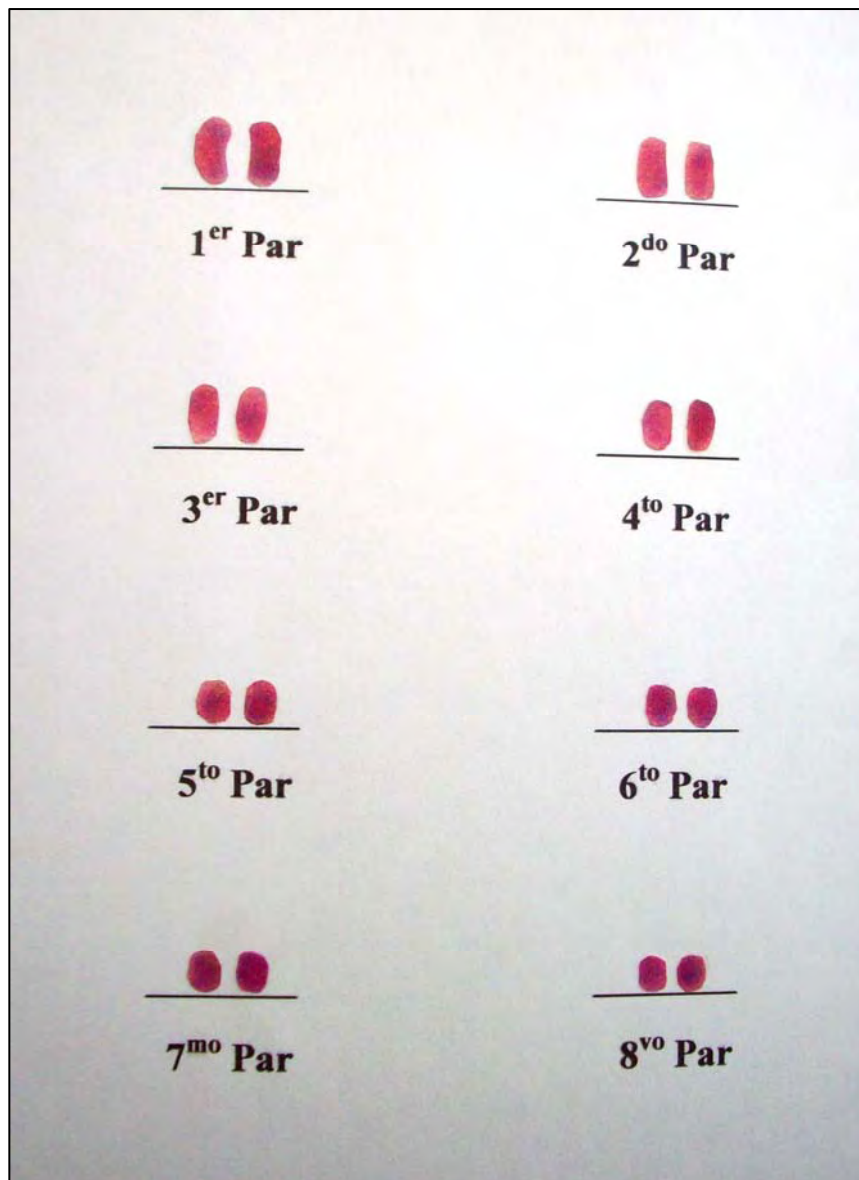


Fig. 01

4.3 Mitosis en células embrionarias de *D. coccus*

De más de 730 preparaciones citológicas, 292 fueron útiles para estudiar la mitosis de *D. coccus* por presentar un alto índice de división. En éstas últimas láminas que involucraron 876 embriones, cada uno de los cuales presentaron cientos de células, se caracterizó cada fase de la mitosis, encontrándose células en interfase de dos tipos, el primero (Fig. 02), mostró una tinción diferencial de la cromatina, donde la cromatina altamente condensada (**flecha azul**) se mantuvo excéntrica y aislada de la cromatina de baja condensación (**flecha roja**), mientras que en el segundo tipo de células (Fig. 03), la condensación y por tanto la tinción de la cromatina fue homogénea y de posición central. El primer tipo celular en profase se caracterizó porque todos los cromosomas condensaron de modo similar (Fig. 04), mientras que en el segundo tipo celular (Fig. 05) algunos cromosomas presentaban mayor condensación y se juntaban entre sí (**flecha azul**).

En **Interfase** y **Profase** se han encontrado dos grupos celulares distintos:

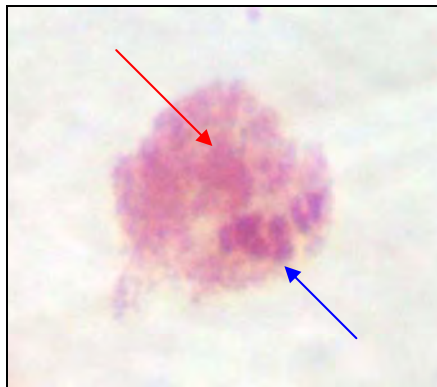


Fig.02

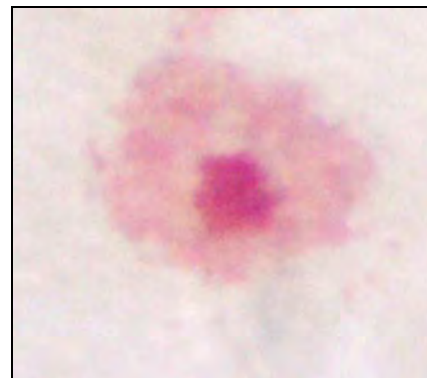


Fig.03

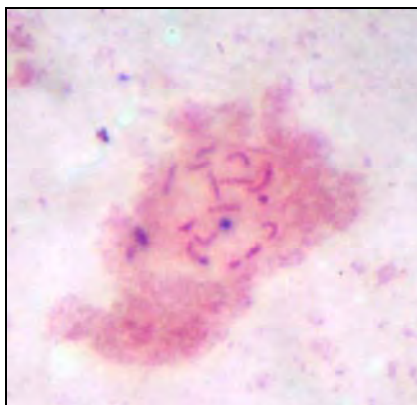


Fig.04

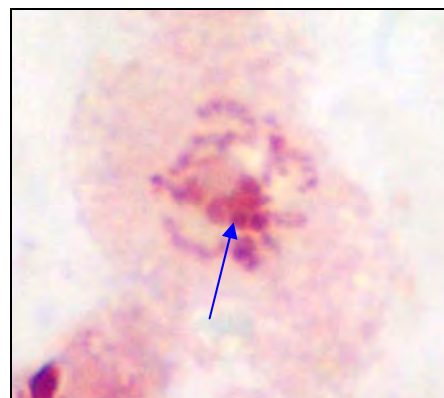


Fig.05

A medida que las células se acercan a la **Metafase** los cromosomas se alinean en el plano ecuatorial y todas las células guardan un patrón de condensación similar en sus cromosomas. En la metafase típica no se aprecia diferencia en la condensación de los cromosomas (Fig. 06, 07).

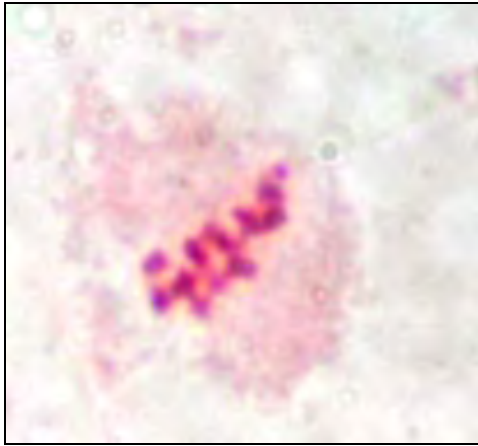


Fig.06

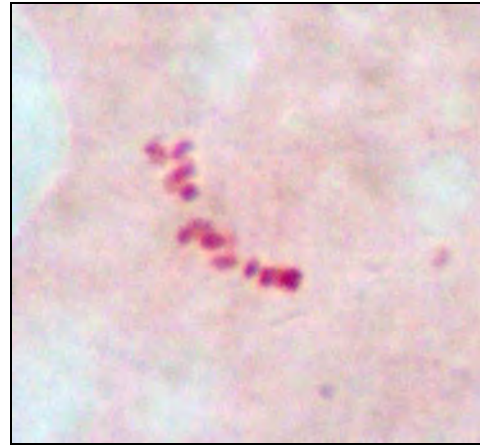


Fig.07

La **Anafase** se aprecia desde el plano ecuatorial y existe una fuerte atracción entre los bloques de cromosomas que migran, observándose la presencia de fibras de cromatina entre los cromosomas que se separan (**flecha verde**), además no se observa la forma de V de los cromosomas al migrar sino la separación es paralela al ecuador (Fig. 08, 09, 10).

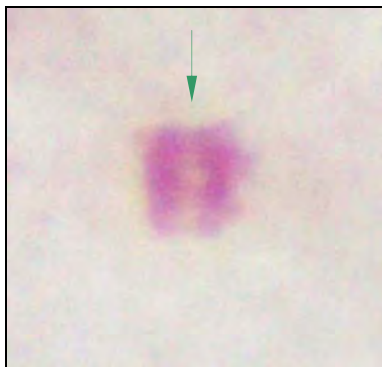


Fig.08

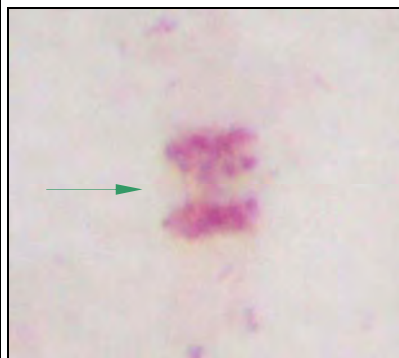


Fig. 09

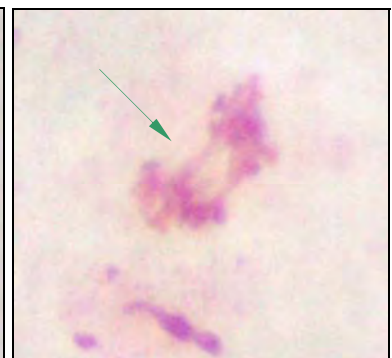


Fig.10

En **Telofase** los grupos de cromosomas se encuentran alejados en los polos como en una telofase normal, no se apreció la presencia de puentes en este grupo (Fig. 11, 12, 13).

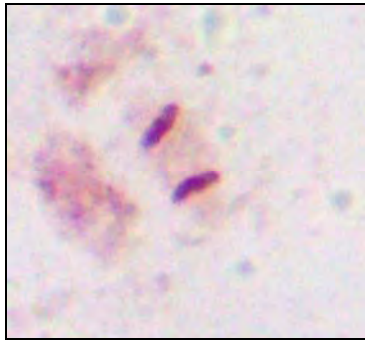


Fig.11

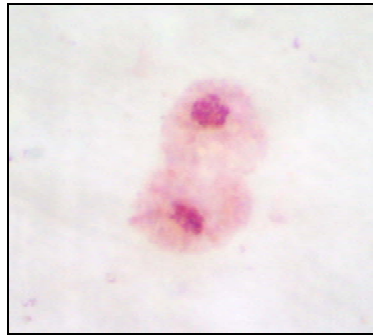


Fig.12

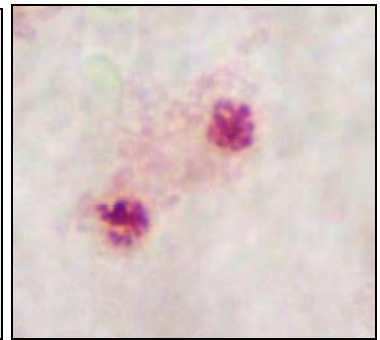


Fig.13

4.4 Poliploidía en células embrionarias de *D. coccus*

Se encontraron células poliploides pero el número de cromosomas no fue determinado debido a que estos se encontraban muy fusionados entre sí, sin embargo en ambos casos parece tratarse de una tetraploidía $4n=32$ (Fig. 15, 17).

A las células poliploides se les ha encontrado rodeadas de células de menor tamaño, este patrón de distribución: célula grande rodeada por varias pequeñas, se repite frecuentemente en los tejidos embrionarios de la especie en estudio (Fig. 14, 16, 18, 19).

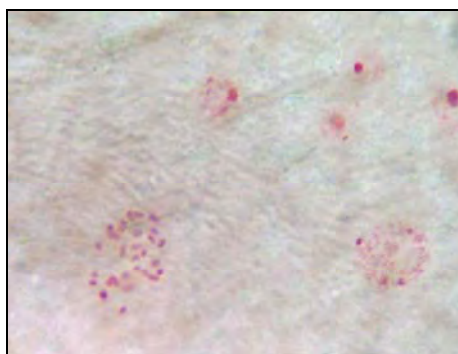


Fig. 14

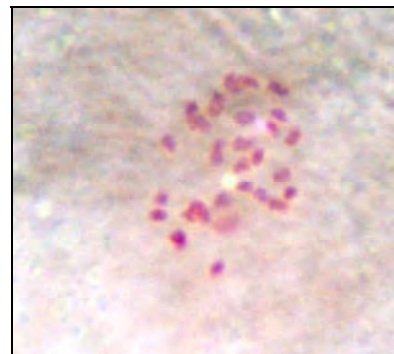


Fig. 15

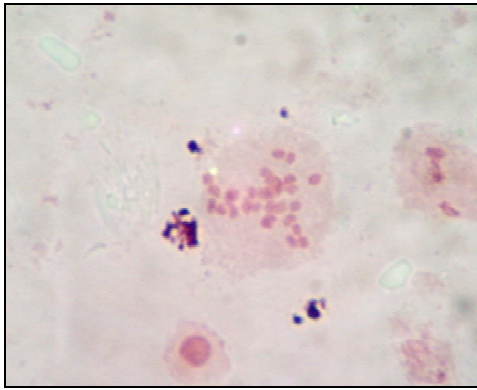


Fig. 16

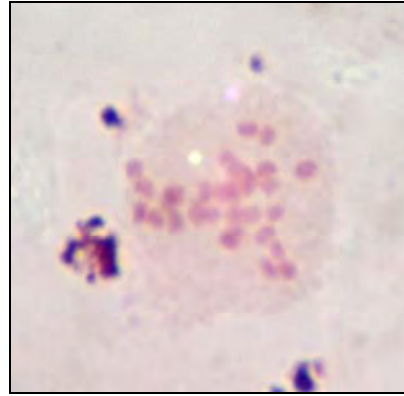


Fig. 17

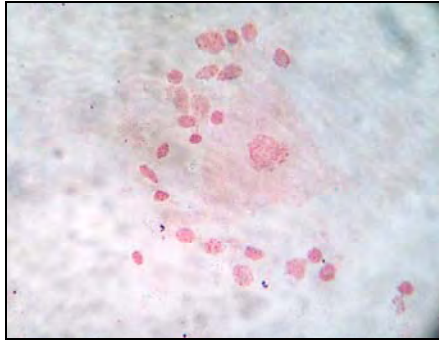


Fig. 18

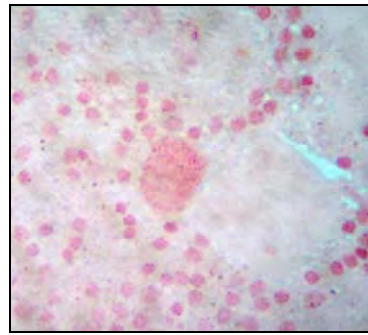


Fig. 19

Obsérvese que las células poliploides tienen alrededor células pequeñas, similar a las imágenes posteriores. ¿Podría tratarse de las mismas células, sólo que en una etapa distinta en su ciclo celular?

4.5 Presencia eventual de micronúcleos MN

De las 730 preparaciones citológicas, sólo en 14 se apreciaron células interfásicas con la cromatina desorganizada y fragmentada (Fig. 20, 21), encontrándose en este grupo células con micronúcleos (Fig. 22, 23, **flecha morada**). En éste último grupo también se encontró una anafase polar (Fig. 24).

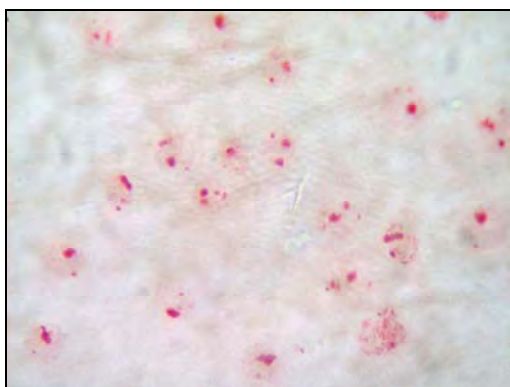


Fig.20

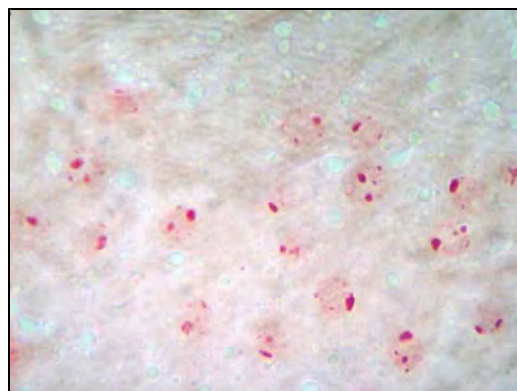


Fig.21

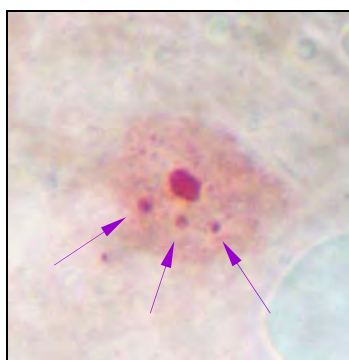


Fig.22



Fig.23

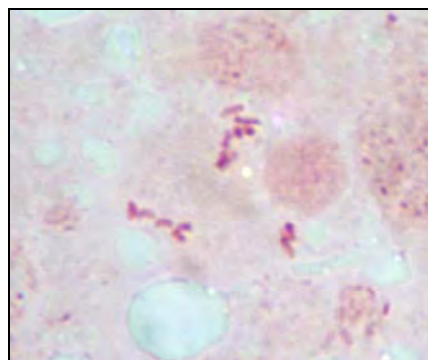


Fig. 24

La presencia de micronúcleos no ha sido estudiada a fondo en la presente investigación, sin embargo es importante mencionarlo porque los micronúcleos, al igual que la anafase polar, son indicadores de contaminación ambiental, lo que se discutirá más adelante.

5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.1 Cariotipo de *Dactylopius coccus* Costa

El estudio cariotípico de una especie permite conocer las relaciones evolutivas, determinar el origen de una especie o género y los eventos que se han dado en el camino de su especiación, por lo que se le considera una herramienta importante en las investigaciones sistemáticas. Así mismo permite a futuro identificar el banco de genes de la especie para luego ubicarlos en el mapa cromosómico, por ejemplo el CMH (complejo mayor de Histocompatibilidad) de clase II está codificado por la región HLA-D del brazo corto del cromosoma 6 en seres humanos.

Por otro lado uno de los caminos en la mejora genética de especies es la realización de cruces interespecíficos, pero ello requiere que antes se conozca el número cromosómico y el comportamiento de los cromosomas de las especies que se cruzan, dicho número es proporcionado por el estudio cariotípico y estos deben de ser iguales en las especies a cruzar de lo contrario existirá un desbalance en la meiosis generando aneuploidías o incluso que los futuros embriones no sean viables.

En el presente trabajo se determinó el cariotipo de *D. coccus*, se encontró que su número diploide es $2n=16$ y todos sus cromosomas son holocéntricos.

En *D. coccus* no es posible seguir la clasificación de Levan *et al.* (1964), debido a que sus cromosomas tienen centrómero difuso, es decir no existe una constricción primaria como la apreciable en los cromosomas monocéntricos, sino el centrómero está distribuido a lo largo de toda la longitud del cromosoma, de modo que todo el muestra movilidad sobre el huso.

En algunas placas fue posible observar la separación total de las cromátidas hermanas, Hughes-Schrader (1948) citado por Aquino (1991) afirma que la naturaleza dual de las cromátidas en cromosomas holocéntricos es observable en profase tardía. Brown & Nur (1964), encontraron que existe dos tipos de células embrionarias en los cóccidos, las primeras se caracterizan porque todos su cromosomas tienen una condensación similar y estos serán futuras hembras, mientras

que el segundo tipo presenta cromosomas con condensación diferencial y estos serán los futuros machos.

En ésta investigación se encontraron células en profase tardía de embriones hembra, donde se observó la condensación similar en todos los cromosomas (Fig. 25) y la separación total de las cromátidas hermanas (flecha negra).



Fig.25

En algunas placas determinados cromosomas han condensado más que otros y a estos últimos se les observa de menor tamaño y de color más intenso (flechas negras), lo que nos permite inferir que se trate de una célula en profase tardía o en proceso metafásico de un embrión macho (Fig. 26).

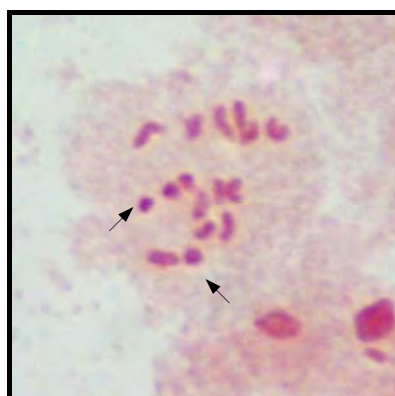


Fig.26

Las diferencias vistas anteriormente pueden explicar en parte la variabilidad en tamaño de los cromosomas en las 20 placas medidas, ya que el estudio cariotípico se ha realizado en embriones hembra y macho.

El promedio de la longitud de cada par de homólogos se acerca más a la longitud mínima de éstos (Cuadro 02), lo que indica que la variación es generada por ciertas placas que se encuentran en un estado menos avanzado de la mitosis (cromosomas menos condensados), como lo apreciado en las placas 20, 3 y 7 (ver anexos) cuyos datos numéricos son los más elevados en contraste con las demás placas que guardan mayor similitud entre sí.

Tradicionalmente la mitosis se divide en 5 fases o etapas sucesivas, cada fase pasa a la siguiente sin que exista una línea de transición definida, es decir el establecimiento de estas 5 etapas está relacionado con procesos típicos que suceden en cada una de ellas. En realidad, como afirman Karp (1998) y Hickman *et al.* (1998), la mitosis es un proceso continuo y esta división se efectúa sólo para facilitar el análisis y la experimentación.

Por lo expuesto, entre la profase y la metafase, al igual que entre cada una de las fases mencionadas líneas arriba, existe un proceso lento y continuo, ésta es la segunda razón por la que se observa variación en la medida de los cromosomas, ya que cada vez éstos se condensan más para ubicarse luego en el plano ecuatorial, hecho conocido como metafase típica (Fig. 27), donde los cromosomas han alcanzado su máximo grado de condensación y precisamente éstas placas tienen las medidas longitudinales más bajas.

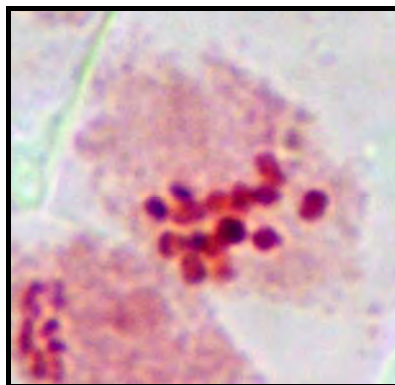


Fig.27

La tercera razón para encontrar variabilidad en el tamaño de las placas examinadas puede atribuirse a que toda la célula y, por tanto, su contenido están expuestos al efecto mecánico-físico del squash y ello, al igual que todo el proceso experimental, pudo generar cierto alejamiento de la medida real, pero no en un grado tan alto como los fundamentados anteriormente.

Se ha observado que cuando los cromosomas se acercan más a la metafase típica, tal como las placas N^{os} 4, 14, 5 y 19 (ver anexos), son más homogéneos entre sí, lo cual hace pensar que todos tienen un tamaño similar. Pero al medirlos se encontraron diferencias, que por pequeñas que fueron, resultaron significativas a la hora de establecer los pares de homólogos. En esta fase, como explican Brown & Nur (1964), no es posible distinguir cuales son las células de embriones destinados a ser machos o hembras por la condensación en grado similar de todos los cromosomas, lo que es observable en el presente trabajo.

Cuando los cromosomas de *D. coccus* llegan al estado de máxima condensación, la longitud de éstos es aparentemente similar, pero al medirlos se tiene que sus longitudes van descendiendo lentamente desde el par más grande hasta el par más pequeño, es decir no hay un cambio drástico como lo observado en la placa N^o 17, donde se podría hablar de cromosomas grandes y pequeños, acá solo podemos decir que el primer par es relativamente algo más grande que el segundo par y éste más grande que el tercero y así de modo sucesivo hasta el octavo par homólogo.

Estos datos coinciden con lo finalmente hallado en el consenso de las 20 placas de las que se obtuvo la longitud relativa promedio (Cuadro 02), y se aprecia finalmente que la longitud relativa de los pares de homólogos va decreciendo gradualmente desde el primer par al último par. Así se tiene que el primer par homólogo representa el 18.37%, el segundo par: el 16.13%, el tercer par: el 14.04%, el cuarto par: el 12.96%, el quinto par: el 11.46%, el sexto par: el 10.16%, el séptimo par: el 9.07% y el octavo par: el 7.81% (Cuadro 03). Estos datos difieren un poco de los obtenidos por Aquino (1991).

Cuadro 03

Datos comparativos de las longitudes relativas de los cromosomas de D. coccus en dos países.

CROMOSOMA (par homólogo)	Longitud Relativa Aquino(1991) México	Longitud Relativa Molero(2008) Perú
1	16.9%	18.37%
2	14.9	16.13
3	13.4	14.04
4	12.4	12.96
5	11.8	11.46
6	11.0	10.16
7	10.1	9.07
8	9.4	7.81

Él menciona que existen cuatro cromosomas grandes y cuatro pequeños como se puede apreciar en sus datos. Nótese que en los primeros cuatro pares de homólogos existe un descenso gradual en la longitud relativa de los cromosomas similares a los obtenidos en este trabajo.

Sin embargo, en los cuatro últimos pares de homólogos los datos de la primera investigación muestran un descenso gradual desde 11.8 hasta 9.4% y guardan mayor similitud entre sí, por lo que son llamados los cuatro pequeños separándose de los otros que serían los cuatro grandes, lo cual no se observa en los datos presentes, ya que los últimos cuatro pares también varían gradualmente desde 11.46 hasta 7.81% y esta variación es similar a los cuatro primeros pares por lo que no se les puede agrupar en cuatro pares grandes y cuatro pequeños sino solo se podrá afirmar que existe un descenso gradual entre los ocho pares de homólogos.

Los datos de Aquino (1991) y Molero (2008) tienen una ligera variación que puede deberse en principio al diferente estadio de las células, ya que él utiliza células en profase tardía mientras que en el presente trabajo se utilizan células en proceso metafásico, es decir células cuya condensación de los cromosomas va desde una profase tardía hasta una metafase típica.

Lo segundo es el grado de condensación diferencial existente en los cromosomas de embriones machos y su influencia en la variación obtenida al medir los cromosomas de esta especie, porque lo más probable es que ambas investigaciones hayan involucrado un número diferente de embriones machos en el análisis cariotípico.

Lo tercero, como se explicó anteriormente, es que las células de ambas investigaciones ciertamente están impactadas por el efecto mecánico-físico del squash.

Aquino utilizó células en profase tardía debido a que él realizó una comparación cromosómica entre la “grana fina” *D. coccus* y tres especies silvestres que presentaron región organizadora de nucléolo, la cual sólo es apreciable en profase tardía. La misma investigación reporta que las especies silvestres tienen $2n=10$ cromosomas y que el primer par es bastante más largo que los demás y además, cuando se suman las longitudes de los cuatro cromosomas pequeños de *D. coccus* este número es altamente similar a la longitud del cromosoma grande presente en las especies silvestres, lo cual hace suponer que los cuatro pares adicionales que tiene la grana fina son producto de la fragmentación del cromosoma grande.

En especies que presentan cromosomas holocéntricos es común observar procesos de fusión y fisión entre los cromosomas que finalmente conduce a la especiación. Esto ha sido observado también por Cook (2000) en *Apiomorpha*, género que reúne especies con alta variabilidad en número cromosómico, así algunas tienen $2n=4$, cuyos cromosomas son grandes, y especies con $2n=192$ cromosomas sumamente pequeños y bastante homogéneos entre sí, lo cual también le hizo suponer a Cook que el origen de este último grupo haya sido la fragmentación de los cromosomas grandes. En este género existen muchas especies con número cromosómico intermedio, postulando que esta fragmentación ha sido en serie, donde el número cromosómico aumentó de $2n=4$ a $2n=10$, $2n=12$, $2n=18$, $2n=32$, $2n=56$, $2n=80$, $2n=144$ y $2n=192$. Otra posibilidad para explicar este fenómeno sería considerarlo a partir de una posible fusión, donde la especie ancestral tuvo un alto número de cromosomas que se fueron fusionando y que dieron como resultado la reducción del número cromosómico. Por otro lado habría que preguntarse si en el género *Dactylopius* existen especies intermedias como lo apreciado en *Apiomorpha*.

No obstante, esta hipótesis es la menos aceptada ya que en ambas investigaciones, tanto para *Dactylopius* y *Apiomorpha*, se encontró que la mayor cantidad de especies citadas tienen un

bajo número cromosómico, lo cual respalda la primera hipótesis de la fragmentación, infiriendo que las especies ancestrales tuvieron un número cromosómico menor que las más evolucionadas.

En general se cree que los cóccidos han iniciado su proceso evolutivo con uno o varios ancestros de bajo número cromosómico pero de mayor tamaño y probablemente con bajo contenido e DNA (Brown, 1961, citado por Aquino, 1991).

Bajo esta perspectiva, si en el género *Dactylopius* se ha dado la fragmentación del cromosoma largo de las especies silvestres ($2n=10$) para dar origen a la grana fina ($2n=16$), habría que preguntarse si dicha fragmentación se dio en las tres mismas regiones del cromosoma largo para dar como resultado cuatro cromosomas pequeños y si en esta fragmentación ha existido la influencia del ambiente o los factores externos que rodean a los individuos, ya que se sabe que el ambiente juega un papel importante en la especiación y los datos obtenidos por Aquino(1991) contrastados con la presente investigación son altamente similares para los cuatro primeros pares de cromosomas donde se ve un descenso gradual en el tamaño, más no así para los últimos cuatro pares (los posibles provenientes de la fragmentación) donde la investigación precedente muestra una longitud similar entre los cuatro cromosomas (los pequeños) y en la presente se observa un descenso gradual entre ellos.

Aquino utilizó cochinillas de Salinas de Hidalgo, San Luis Potosí, en México, localizado entre los $100^{\circ} 00'$ y $102^{\circ} 4'$ Longitud Oeste y los $21^{\circ} 45' 30''$ Latitud Norte mientras que en Perú se utilizaron cochinillas de San Bartolomé, Huarochirí, Lima, localizado entre los $11^{\circ} 54' 26''$ Latitud Sur y $76^{\circ} 31' 28''$ Longitud Oeste. De ser cierta la fragmentación cromosómica del quinto par largo (*spp.* silvestres), es probable que haya habido una influencia ambiental y geográfica para determinar los tres puntos de ruptura en el cromosoma, ya que las medidas longitudinales obtenidas de los últimos cuatro pares de homólogos de *D. coccus*, varían entre México y Perú.

Gracias al aporte de Aquino se sabe que *D. confusus* y otras dos especies silvestres no determinadas tienen $2n=10$ cromosomas y *D. coccus* $2n=16$, pero no se conocen estos datos para *D. bassi*, *D. austrinus*, *D. ceylonicus*, *D. confertus*, *D. salmianus*, *D. tomentosus* y *D. zimmermanni*. Todas las especies del género *Dactylopius* están dispersas a lo largo del continente americano y el éxito para su sobrevivencia en cada lugar ha dependido en gran parte

de los factores externos: clima, geografía, predadores naturales, etc. Así la especie predominante en el Perú es *D. coccus* (Marín, 2008 com. pers.) y en muchos lugares como en San Bartolomé, se desarrolla sin ninguna atención por parte de los agricultores, a diferencia de Argentina, Colombia, México y Chile donde los agricultores ponen mayor esmero en el cultivo de la grana fina y ésta es menos abundante que las especies silvestres.

5.2 Mitosis en *D. coccus*

El ciclo celular de la célula eucariota se divide en dos etapas importantes, la etapa de interfase que puede durar horas, días, semanas o más, dependiendo del tipo celular y la etapa de mitosis que dura entre treinta a sesenta minutos (Karp, 1998), por lo cual podemos entender porque es más frecuente encontrar células en interfase. Aunque se ha dicho que los cromosomas son “como el muerto en el funeral” ya que toda la atención se centra en ellos pero estos no se mueven independientemente, ya que dependen de las fibras del huso (Alberts *et al.*, 1996), el periodo que suele ser más atractivo bajo el microscopio es la mitosis debido al desplazamiento de los cromosomas (Hickman *et al.*, 1996, Karp, 1998). Sin embargo en *D. coccus* la interfase de algunos embriones sí es llamativa debido a que se observa como un grupo de cromosomas se aíslan del resto, se condensan más y por tanto se les ve más teñidos (Fig.02).

Brown & Nur (1964) encontraron que en los machos de *Pseudococcidae* el juego paterno de cromosomas se condensan más, haciéndose heterocromáticos, y además tienden a mantenerse juntos en el estado embrionario y en meiosis van a ser destruidos ocasionando que los espermatozoides provengan únicamente de cromosomas maternos, lo cual también fue observado en *D. coccus* por Aquino (1991), donde el grupo heterocromático se mantiene junto a lo largo de la meiosis. Por lo tanto, el aislamiento observado de un grupo de cromosomas, así como su alta condensación, nos indica que se trata de células de embriones macho.

En los cóccidos existe dos mecanismos de determinación sexual, la primera involucra la presencia de un cromosoma sexual (XX, XO) y la segunda depende de la heterocromatinización

de los cromosomas paternos y ello se presenta en las familias más evolucionadas (Nur, 1980). Dentro de este último grupo se encuentra la familia Dactylopiidae.

El estudio de la mitosis de *D. coccus* resulta de particular interés debido a la naturaleza holocéntrica de sus cromosomas, y el que dicho estudio se haga en células embrionarias lo hace doblemente importante porque en la embriogénesis se da el mecanismo de determinación del sexo (Nur, 1990).

Conociendo lo anterior centrémonos ahora en los resultados. Cuando las células están en **Interfase** si son células embrionarias de hembra, el citoplasma se observa homogéneo debido a que la cromatina proveniente del padre y de la madre están condensando de modo similar (Fig.03), mientras que en la imagen de al lado se observa un cúmulo de cromatina aislado que podría ser confundido con el núcleo, pero por su forma irregular y su posición excéntrica es más probable que se trate del grupo de cromosomas heterocromáticos (H) de origen paterno, que tienden a reunirse entre sí, alejándose del grupo eucromático (E) de línea materna, cuya condensación es más lenta y es de baja tinción.

Cuando la célula está en mitosis se verán claramente los dos casos explicados líneas arriba. En **Profase** los cromosomas de células embrionarias hembra van a ser homogéneos entre sí (Fig.04) y cuando esta fase está acercándose a la metafase va a ser posible visualizar por separado las dos cromátidas hermanas (Hughes-Schrader, 1935) como se aprecia en la placa N° 03 (Fig.25). Pero la naturaleza dual del cromosoma holocéntrico también se puede apreciar en metafase al realizar una tinción con nitrato de plata (Nokkala *et al.*, 2002). En los embriones macho se va a poner más de manifiesto la condensación diferencial que ya se observaba en interfase, pudiendo distinguirse la separación entre el grupo heterocromático (H) y el grupo eucromático (E) y si la hipotonización o el squash no han sido buenos es muy difícil determinar el número real de cromosomas debido a que tienden a fusionarse entre sí (Fig.68 y 69).

Una vez que la célula llega a la **Metafase**, como se explicó en el análisis del cariotipo, todos los cromosomas guardan homogeneidad en condensación, por lo que se les observa similares en

tamaño y tinción y ya no es posible distinguir por separado el grupo H del E (Hughes-Schrader, 1935, Brown & Nur, 1964).

Por otro lado, en muchas placas en proceso metafásico, en especial en las que se acercan a una metafase típica, se ha observado la presencia de formaciones fibrilares de cromatina que unen los cromosoma como en las placas N° 02, 04, 09, 12 y 14 (ver anexos) las cuales son denominadas ligaciones cromosómicas y han sido encontradas antes en cromosomas mitóticos de *Phaseolus lunatus* (Bracamonte, 1992), *Capsicum pubescens* (Siles, 1996) y en los cromosomas politénicos de *Rhynchoscarica angelae* (Guevara, 1975). En esta última especie es muy frecuente y está relacionado con el estadio larval. Bracamonte (1992) refiere que estas ligaciones entre cromosomas van a permitir que se guarde un orden tridimensional en la célula y que por lo general las ligaciones unen cromosomas similares (homólogos), lo que favorece el ordenamiento dentro de la célula.

Se sabe que cuando un cromosoma se fragmenta, posterior a esta ruptura las regiones teloméricas tienden a unirse, como ha sido demostrado a nivel molecular en *Arabidopsis mutants* (Mokros *et al.*, 2006) y estas ligaciones luego son observadas como puentes cuando la célula entra a anafase. Estas ligaciones cromosómicas también se presentan en las especies de *Apiomorpha* que tienen bajo número cromosómico, aunque el autor no da detalle sobre las mismas, pero en este caso también podría poner de manifiesto el origen común que tienen estas regiones que se unen de manera similar a lo que sucede en *A. mutants*.

En las células de *D. coccus* estas ligaciones son una evidencia de que los cromosomas tienden a fusionarse entre sí, dificultando en muchos casos el conteo y la individualización. Las mismas no se manifiestan en todos los cromosomas y cuando se les ve no necesariamente unen homólogos.

La placa **Anafásica** es peculiar en *D. Coccus* por su diferencia con una anafase típica donde los cromosomas son monocéntricos, en la que una vez que las fibras del huso mitótico se unen al cinetocoro cada cromátida hermana va a ser arrastrada hacia los polos opuestos de la célula, lo cual hace que en la migración se les observe en forma de **v** o **Λ** (Pérez *et al.*, 1997) dependiendo del polo al que migren, pero en el caso de la especie en estudio al igual que en otras que tienen centrómero difuso, el huso mitótico va a unirse a lo largo de toda la longitud de las cromátidas, va a jalar de estas hacia los polos y no será posible visualizar la forma anteriormente mencionada sino se apreciará como en línea recta (Muramoto, 1985; Nokkala *et al.*, 2002).

Algo característico de la anafases de *D. coccus* es la presencia de puentes entre los dos bloques migrantes, lo que puede ser una manifestación continua de las ligaciones cromosómicas que se apreciaron en metafase. Dichos puentes a veces se ven bastante densos, como si estuviesen formados por uno o más cromosomas, pero en la mayoría de los casos se ve que son sólo fibras de cromatina bastante finas que se ven como hilos entre ellos. Todas las anafases observadas en estado temprano y medio han mantenido esta característica, pero a medida que los cromosomas se acercan a los polos estas fibras de cromatina o en general nexos entre los bloques migrantes desaparecen por completo, así la **Telofase** se visualiza de modo normal como en cualquier célula eucariota. Una vez que los bloques de cromosomas han migrado por completo hacia los polos opuestos la célula está lista para el inicio de la citocinesis y los cromosomas de las células hijas empiezan a descondensarse lentamente.

5.3 Células Poliploides en *D. coccus*:

En las células poliploides que se obtuvieron no fue posible contabilizar con exactitud el número de cromosomas debido a que ellos tienden a fusionarse entre sí, pero pese a ello en ambas células (Fig.15 y 17.) parece tratarse de tetraploidía $4n=32$.

Debido a que las células poliploides van a albergar mayor cantidad de cromosomas y porque se originan a partir de una endorreplicación, ellas van a ser de mayor tamaño que las demás células a su alrededor. Lo sobresaliente en nuestras observaciones citológicas es que este mismo patrón ha sido observado repetidas veces en el desarrollo de los embriones de *D. coccus* (Fig.18 y 19), pudiendo pensarse que las células grandes son las poliploides, sólo que no están en actividad mitótica.

Este patrón de célula grande rodeada por células pequeñas es similar a lo que sucede en humanos en el proceso conocido como **educación tímica**, donde una célula nodriza se rodea de muchos linfocitos de pequeño tamaño para “enseñarles” a reconocer lo propio de lo extraño. Esta célula nodriza no es una célula poliploide, pero lo rescatable de este proceso es esa gran diferencia de tamaños y la distribución espacial entre ambos tipos celulares, reflejando que guardan una estrecha relación entre sí. En el caso de *D. coccus*, tratándose de células embrionarias, las células

grandes rodeadas por pequeñas posiblemente tengan la función de nutrirlas, lo cual concuerda con lo expuesto por Hughes-Schrader (1948), citada por Aquino (1991), quien menciona que la poliploidización en embriones es común y está relacionada con el desarrollo embrionario. Si este proceso es común y está relacionado con el desarrollo de los embriones es posible que las células grandes que se observan rodeadas de muchas células pequeñas sean las poliploides, sólo que no están en división, ya que si lo estuviesen, todo el gasto energético de la célula estaría destinado a la duplicación del material genético y de las organelas, por lo que no sería posible que al mismo tiempo de estar en división celular tenga también que desempeñar el rol de nodriza ya que ello implicaría demasiado gasto energético para la célula.

5.4 Presencia eventual de micronúcleos (MN)

Los micronúcleos se han definido como cromosomas, o restos de cromosomas, que se desintegran del núcleo quedando fuera de éste. Así, cuando un cromosoma se parte, las regiones que no poseen centrómero no podrán migrar y quedarán a un lado como núcleos de menor tamaño, llamándose ahora micronúcleos, pero su origen no se le atribuye únicamente a la ruptura cromosómica sino también a que el huso no reconoce las regiones centroméricas (cinetocóricas) de determinados cromosomas.

En *D. coccus* el primer caso no podría darse debido a que cada uno de los fragmentos cromosómicos, si es que los hubiese, tienen la capacidad de migrar hacia los polos gracias a la naturaleza holocéntrica de sus cromosomas. Ya que el centrómero es difuso cada fragmento va a actuar como una entidad independiente. Podría entonces darse el caso de que el huso no haya reconocido determinado cromosoma o grupo de cromosomas y que ellos no hayan podido migrar en anafase, quedando finalmente como micronúcleos una vez concluida la telofase.

Muchos investigadores como Liu *et al.* (1994), Márquez (2005), Hick *et al.* (2007), entre otros, han indicado que la presencia de micronúcleos es indicio de contaminación ambiental, en su mayoría por metales pesados aunque también ha sido encontrado, pero con menor frecuencia, por contaminación con dióxido de carbono.

En la presente investigación se ha observado la presencia eventual de micronúcleos, pero esto ha sido bastante raro ya que en más de 730 preparaciones citológicas, conteniendo cada una tres embriones, solo se observaron MN en 14 láminas.

Como se aprecian en las imágenes, las células tienen la cromatina bastante desorganizada, lo que evita que entren en mitosis, ya que cuando el índice de MN aumenta, el índice mitótico disminuye (Castro *et al.*, 2004). Los investigadores señalan que cuando existen MN es usual que se aprecien puentes anafásicos, telofásicos y también anafases polares. En *D. coccus* los puentes en la placa anafásica se presenta esporádicamente al igual que en otros organismos que tienen cromosomas holocéntricos como *Phenacoccus acericola* (Hughes-Schrader, 1935) y también han sido encontrados en la especie bajo estudio por Aquino (1991) en células meióticas, lo que indica que es característico de la placa anafásica y no se le puede tomar como un indicador de la continuidad de los micronúcleos. Sin embargo en este último grupo analizado se encontró una anafase polar (Fig.24), lo que sí puede ser tomado como un indicador de contaminación ambiental.

Ello no es lejano a la realidad porque San Bartolomé, si bien es cierto es un lugar bastante limpio, donde no se pone de manifiesto la actividad agrícola y la cochinilla se desarrolla naturalmente, es ciertamente impactado por la actividad ferroviaria diaria, generando contaminación ambiental.

Es altamente probable que la colecta de individuos de este último grupo haya sido en un área que pudo contener componentes dañinos para la cromatina, ya sea el suelo o las partículas del aire, que finalmente se depositarán en las pencas y en la cochinilla.

Esta presencia muy extraña de micronúcleos sugiere que se analice a fondo si en San Bartolomé existe contaminación por metales pesados u otros agentes, pero si se realizase un estudio de este tipo, es recomendable utilizar especies que tengan cromosomas monocéntricos ya que la naturaleza de los cromosomas de *D. coccus* no favorece este tipo de análisis por los puntos explicados líneas arriba.

6. CONCLUSIONES

1. La especie *Dactylopius coccus* tiene como número cromosómico $2n=16$ para ambos sexos.
2. Los cromosomas de *Dactylopius coccus* son de tipo holocéntrico en los cuales no se observa constricción primaria.
3. La longitud de los cromosomas de *Dactylopius coccus* están en un rango de 0.70 μm . hasta 1.64 μm . y se observa un descenso gradual en los ocho pares de homólogos.
4. La variabilidad encontrada entre las placas metafásicas de *Dactylopius coccus*, analizadas en la presente investigación, se debe principalmente al grado de condensación diferencial de los cromosomas paternos en embriones machos.
5. La diferencia entre los datos obtenidos por Aquino (1991) en México, con la presente investigación, en especial en los últimos cuatro pares cromosómicos, indicaría la influencia del ambiente en el comportamiento del complemento cromosómico.
6. En embriones machos de *Dactylopius coccus* los cromosomas de origen paterno (H) tienden a agruparse entre sí, aislándose del resto y ocurre desde la interfase hasta la prometafase de la mitosis, lo cual es conocido como heterocromatinización que es un mecanismo relacionado a la determinación del sexo.
7. En la metafase mitótica de células embrionarias de *Dactylopius coccus*, el grado de condensación es similar entre los ocho pares de cromosomas por lo que esta fase no es útil para reconocer el sexo del embrión.

8. En metafase algunos cromosomas de *Dactylopius coccus* presentan ligaciones cromosómicas entre ellos, los cuales van a ser vistos como puentes entre los dos bloques migrantes en la anafase temprana, pero llegan a desaparecer cuando la célula se acerca a la telofase.
9. En la anafase mitótica de *Dactylopius coccus*, los cromosomas al migrar no muestran la conformación V porque la separación de las cromátidas es paralela al plano ecuatorial (metafase).
10. Las células poliploides están relacionadas con el desarrollo del embrión y su rol es probablemente nutrir a las células de menor tamaño que la rodean.
11. La presencia de micronúcleos MN, al igual que la anafase polar, encontradas en un grupo pequeño de muestras evidenciaría daño genotóxico causado por contaminación ambiental.

7. RECOMENDACIONES

1. Es necesario realizar estudios similares a este trabajo en las especies de cochinilla, *Dactylopius spp.*, que aún no han sido evaluadas, ya que ello permitiría descubrir los arreglos cromosómicos que se dieron en su especiación.
2. Se requiere hacer análisis a nivel molecular para determinar que regiones se unen frecuentemente en el proceso conocido como fusión cromosómica.
3. Es importante realizar análisis de impacto ambiental en la zona de colecta, San Bartolomé, para descartar la presencia de agentes genotóxicos, y si es a nivel citológico, es preferible utilizar especies con cromosomas monocéntricos.

8. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

ADEX. 2006. Boletín N° 167. Boletín Semanal de ADEX (Asociación de Exportadores del Perú) [http:// www.adexperu.org.pe](http://www.adexperu.org.pe). 20 de Noviembre del 2007.

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Watson, J. D. 1996. Biología molecular de la célula. 3^{ra} Edición. Editorial Omega S.A. Madrid. España. pp.56-61.

Aquino, G. 1991. Estudio Cromosómico en Cuatro Tipos de Cochinilla (*Dactylopius spp.*) (Homóptera: Dactylopiidae) del Nopal (*Opuntia spp.*). *Tesis presentada como requisito parcial para optar el grado de Maestro en Ciencias, especialista en Fruticultura*. Colegio de Postgraduados, San Luis Potosí-México. 106p.

Aquino-Pérez, G. & Bárcenas, N. M. 2002. Reproductive biology and genetic of Cochineal insect (*Dactylopius spp.*). Cactusnet Issue N° 7: 6-10.

Berlowitz, L. 1964. Correlation of genetic activity, heterochromatinization, and RNA metabolism. Proc. Nat. Acad. Sci. 53: 68-73.

Bongiorni, S., Mazzuoli, M., Masci, S. & Prantera, G. 2001. Facultative heterochromatinization in parahaploid male mealy bugs: involvement of a heterochromatin-associated protein. Development 128: 3809-3817.

Bracamonte, O. 1992. Citogenética de *Phaseolus lunatus* L. *Tesis para optar el grado de Magíster en la especialidad de mejoramiento genético de plantas*. Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima-Perú.

Brown, S.W. & Nelson- Res. 1961. Radiation analysis of a lecanoid genetic system. Genetics 46: 983-1007.

Brown, S. W. & Uzi Nur. 1964. Heterochromatic Chromosomes in the coccids. *Science* 145: 130-136.

Brown, S. W. 1966. Heterochromatin. *Science* 151: 417-425.

Bustamante, J. A. 2002. Production, transformation and sales of cochineal products made in Chile. *Cactusnet Issue N° 7*: 21-23.

Caselín-Castro, S., Llanderal-Cázares, C., Ramírez-Cruz, A., Soto, M. & Méndez-Montiel, J. 2008. Caracterización morfológica de Hemocitos de la hembra de *Dactylopius coccus* Costa (Hemiptera: Coccoidea: Dactylopiidae). *Agrociencia* 42 (3): 49-55.

Castañeda, C. 2008. Evaluación genotóxica de la toxina botulínica tipo A (Botox /Allergan), mediante la prueba de micronúcleos en un modelo *in vivo* de ratón. *Proyecto de tesis de postgrado para obtener la especialidad en: Cirugía Plástica y Reconstructiva*. Universidad de Guadalajara. Jalisco-México. 39p.

Castro, R., Ramírez, V. & Cuenca, P. 2004. Micronúcleos y otras anomalías nucleares en el epitelio oral de mujeres expuestas ocupacionalmente a plaguicidas. *Rev. Biol. Trop.* 52(3): 611-621.

Chandra, S. H. 1962. Inverse meiosis in triploid females of the mealy bug, *Planacoccus citri*. *Genetics* 47: 1441-1454.

Cortés, D., Vigueras, A. & Portillo, L. 2005. Relación del aparato reproductor femenino de *Dactylopius coccus* Costa (Hemiptera : Dactylopiidae) en la síntesis del ácido carmínico. *Scientia-Cucba* 7(2): 131-138.

Cook, L. G., Gullan, P. J. & Stewart, A. C. 2000. First-instar morphology and sexual dimorphism in the gall-inducing scale insect *Apiomorpha* Rübsaamen (Hemiptera: Coccoidea: Eriococcidae). *Journal of Natural History* 34: 879-894.

Cook, L. 2000. Extraordinary and extensive karyotypic variation: A 48-fold range in chromosome number in the gall-inducing scale insect *Apiomorpha* (Hemiptera: Coccoidea: Eriococcidae). *Genome* 43: 255-263.

Darlington, C.D. & La Cour, L.F. 1969. *The Handling of Chromosomes*. Fifth Edition, George Allen & Unwin Ltd., London.

De Lotto, G. 1974. On the status and identity of the cochineal insects (Homoptera: Coccoidea: Dactylopiidae). *J. Ent.Sth.Afr.* 37 (1):167-193.

Dernburg, A. 2001. Here, there and everywhere: Kinetochore function on holocentric chromosomes. *The Journal of Cell Biology* 153 (6): 33-38.

De Souza, M.J., Franklin de Melo, N. 2007. Chromosome study in *Schistocerca* (Orthoptera-Acrididae-Cyrtacanthacridinae): karyotypes and distribution patterns of constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions (NORs). *Genet. Mol. Biol.* 30(1): 54-59.

Díaz, J. & Quispe, L. 1989. Algunos aspectos sobre la bioecología de la cochinilla del cactus (*Dactylopius coccus* Costa). *Revista del INIAA: Investigación agrícola en marcha*. 1(2): 8-11.

Domínguez, A., Rojas, E., Romero, L., Rodríguez, J.C. Pérez, I. 2006. Lesiones genéticas y citológicas inducidas por la exposición a químicos en centros de trabajo. *Salud de los Trabajadores*. 14 (1): 51-59.

Ferris, G. F. 1955. *Atlas of the scale insects of North America: the families Aclerdidae, Asterolecaniidae, Conchaspidae, Dactylopiidae and Lacciferidae*. III. Stanford University Press, Palo Alto, California. 233 p.

Flores, V. I. 2002. Physycal-chemical characterization of cochineal *Dactylopius coccus* Costa producer areas in the Andean Trapeze Bar Departments: Huancavelica, Ayacucho and Apurímac, Perú. *Cactusnet Issue N° 7*: 16-20.

- García, F., Aguilar, P., Celma, A., Lanz, H., Del Río, I & Hernández, F. 2002. Identificación y caracterización parcial del gen de la enzima profenoloxidasa en *Dactylopius coccus*. Investigación Universitaria Multidisciplinaria, Universidad Simón Bolívar 4:12-17.
- García, F., Rojas, A., Pétriz, E. & Hernández, F. 1999. *Dactylopius coccus* y *Dactylopius sp.*: Detección de polimorfismos en el DNA usando RAPD-PCR y comparación entre especies. Investigación Universitaria Multidisciplinaria, Universidad Simón Bolívar 2: 16-22
- Gonzáles, M., Bárcenas, N., Aquino, G., Valdéz, J, Ortega, M. & Ramírez, I. 2002. Cultivo *in vitro* de Células Embrionarias de Cochinilla (*Dactylopius coccus* Costa) a diferentes pH. Rev. Fitotec. Méx. 25(2): 209-212.
- Gonzáles, R. 1998. Estudio Citogenético en *Cyclanthera pedata* Schrad “caigua”. Tesis para optar el grado de Biólogo con mención en Biología Celular y Genética. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima-Perú. 58p.
- Guevara, M. 1975. Cromocentro - Centrómero e pareamento ectópico em cromossomos politénicos de varios tecidos de *Rhynchosciara angelae*. Nonato e Pavan (1951). Ciencia e Cultura. 27(10): 1132-1138.
- Gullan, P. J. & Cook, L. G. 1997. Are cochineal insects eriococcids?. Entomol. 33: 91-99.
- Gullan, P. & Korztarab. 1997. Adaptation in scale insects. Annu. Rev. Entomol. 42: 23-50.
- Harbhajan, K., Chhabra S., Suman V. & Gupta, M. 2006. Chromosomes and their Meiotic Behavior in Two Families of the Sub-order Heteroptera. Cytologia 71(2): 111–118.
- Hick, A., Paczkowski, A., Gadano, A. & Carballo, M. 2007. Biomarcadores de Genotoxicidad en Individuos Expuestos al Arsénico. Lat. Am. J. Pharm. 26 (5): 691-699.
- Hickman, C., Roberts, L. & Parson, A. 1998. Principios Integrales de Zoología. 4ta Edición. Editorial Mc Graw-Hill Interamerica Editores S.A. de C.V. España. pp.56-61.

- Howe, M., Mc Donald, K., Albertson, D. & Meyer, B. 2001. HIM-10 Is required for kinetochore structure and function on *Caenorhabditis elegans* holocentric chromosomes. *The Journal of Cell Biology* 153(6): 1227-1238.
- Hughes-Schrader, S. 1935. The chromosome cycle of *Phenacoccus* (Coccidae). *Biol Bull* 69: 462-468.
- Hughes-Schrader, S. 1943. Polarization, kinetochore movements, and bivalent structure in the meiosis of male mantids. *Biol Bull* 85: 265-300.
- Karp, G. 1998. *Biología Celular y Molecular*. 2^{da}. Edición. Editorial Mc Graw-Hill Interamerica Editores S.A. de C.V.España. pp.580-604.
- King, G. C. 1958. The cytology of the desmids: The chromosomes. *New Phytologist* 59: 65-72.
- Kiran, Y. & Sahin, A. 2006. The effects of Cadmium on Seed Germination, Root Development and Mitotic of Root Tip Cells of Lentil (*Lens culinaris* Medik). *World Journal of Agricultural Sciences* 2(2): 196-200.
- Kitchin, R. 1975. Intranuclear destruction of heterochromatin in two species of armored scale insects. *Genetica* 45: 227-235.
- Lacadena J. R.1996. *Citogenética*.1^{ra} Edición. Editorial Complutense S.A. Madrid. España.
- Lambdin, P. L., Aquino, G. P., Green, J. F. & Soto-Hernández, M. 2002. Synopsis of carmine acid biosynthesis. *Cactusnet Issue* N° 7: 11-15.
- Levan, A., Fredga, K. & Sandberg, A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 201-220.

- Liu, D., Jiang, W., Wang, W., Zhao, F. & Lu, C. 1994. Effects of lead on root growth, cell division, and nucleolus of *Allium cepa*. Environ. Pollut. 86(1): 1-4.
- Lock, O.1997. Colorantes Naturales. Pontificia Universidad Católica del Perú, Fondo Editorial, Lima, 274 pp.
- Mandrioli, M., Ganassi, S., Bizarro, D. & Manicardi, C. 1999. Cytogenetic análisis of the holocentric chromosomes of the aphid *Schizaphis graminum*. Hereditas 131: 185-190.
- Marín, R. & Cisneros, F. 1977. Biología y Morfología de la cochinilla del carmín *Dactylopius coccus* Costa (Homóptera: Dactylopiidae). Rev. Per. Entom. 20(1):115-120.
- Márquez, C. 2005. Micronúcleos e índice Mitótico en branquias de mejillón *Mytilus californianus* (Conrad 1837) expuestos a petróleo. Rev. Int. Contam. Ambient. 21 (Supl.1): 43-48.
- Mokros, P., Vrbsky, J. & Siroky, J. 2006. Identification of chromosomal fusion sites in *Arabidopsis* mutans using sequential bicolour BAC-FISH. Genome 49: 1036-1042.
- Monge, R., Monge, D. & Villaroel, R. 1990. Un método para explotación intensiva de la cochinilla del carmín en cladodios de uno a tres años. En: Resúmenes del XXXIII CNE Cusco. N° 51.
- Moore, L. & Roth, M. 2001. HCP-4, a CENP-C like protein in *Caenorhabditis elegans*, Is required for resolution of sister centromeres. The Journal of Cell Biology 153(6): 1199-1207.
- Muramoto, N. 1985. A study of the holocentric chromosomes by a simple method for differential stain. Proc. Japan Acad. 61(5): 215-218.
- Nokkala, S., Laukkanen, A. & Nokkala, C. 2002. Mitotic and meiotic chromosomes in *Somatochlora metallica* (Cordulidae, Odonata). The absence of localized centromeres and inverted meiosis. Hereditas 136: 7-12.

Nur, U. 1967. Reversal of heterochromatinization and the activity of the paternal chromosome set in the male mealy bug. *Genetics* 56: 375-389.

Nur, U. 1980. Evolution of unusual chromosome systems in scale insects (Coccoidea: Homoptera). In: Blackman RL, Hewitt GM, Ashburner M (eds) *Insect Cytogenetics*. Blackwell Sci Publs, Oxford, pp 97-118.

Nur, U. 1982. Destruction of specific heterochromatic chromosomes during spermatogenesis in the *Comstockiella* chromosome system (Coccoidea: Homoptera). *Chromosoma (Berl.)* 85: 519-530.

Nur, U. 1989. Chromosomes, Sex- Ratios, and Sex Determination: Reproductive Biology and Genetics, in *Armoured Scale insects, Their Biology Natural Enemies and Control*. Vol. A. Elsevier Science Publisher B. V., Amsterdam, The Netherlands. pp.179-190.

Nur, U. 1990. Heterochromatization and euchromatization of whole genomes in scale insects (Coccoidea: Homoptera). *Development Supplement*. 108: 29-34.

Palomino, J. 1998. Evaluación del efecto del abonamiento, poda e Infestación Artificial de Cochinilla en una población silvestre de tuna en Ayacucho. *Tesis para optar el grado de Ingeniero Agrónomo*. Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga. Ayacucho-Perú.

Papeschi, A.G. 1996. Sex chromosome polymorphism in a species of *Belostoma* (Belostomatidae, Heteroptera). *Hereditas* 124: 269-274.

Pérez, M. & Becerra, R. 2001. Biodiversitas. *Bol.Bim.Com. Nac. Conoc. Biod.* 36:2-8.

Pérez, R., Panzera, F., Page, J., Suja, J. & Rutas, J. 1997. Meiotic behaviour of holocentric chromosomes: orientation and segregation of autosomes in *Triatoma infestans* (Heteroptera). *Chromosome Research* 5: 47-56.

Pérez, R., Hernández, M., Rose, V., Calleros, L. & Panzera, F. 2003. Citotaxonomía y evolución cromosómica en Triatominae, Insectos Vectores de la Enfermedad de Chagas (Heteróptera-Reduviidae). Entomol. Vect. 10 (4): 543-550.

Portillo, L. & Viguera, A. L. 2002. Mexico before the worldwide production of cochineal. Cactusnet Issue N° 7: 3-5.

Portillo, L. 2005. Origen de *Dactylopius coccus* Costa (Hemíptera: Dactylopiidae): ¿Norte o Sudamérica? Dugesiana 12(1):1-8.

Powers, J., Rose, D., Saunders, A., Dunkelbarger, S., Strome, S. & Saxton, W. 2004. Loss of KLP-19 polar ejection force causes misorientation and missegregation of holocentric chromosomes. The Journal of Cell Biology 166(7): 991-1001.

Prieto, F., Báez, O., Scoot, W., Gaytán, J. & Zuñiga, A. 2006 a. Acumulación, toxicidad y teratogénesis provocada por presencia de arsénico en aguas en el pez cebra (*Danio rerio*). Revista AquaTIC 24: 72- 85.

Prieto, F., Lechuga, M., Vargas, Méndez, M., Barrado, E. & Gaytán, J.C. 2006 b. Daños tóxicos en tejidos vegetales, producidos por aguas contaminadas con arsénico en Zimapán, Hidalgo, México. Ciênc. Tecnol. Aliment. 26(1): 94-97.

Quispe, I., Jeri, A. & Flores, V. 1990. Infestación y Mortalidad de *Dactylopius coccus* durante épocas lluviosas en Ayacucho. En: Resúmenes del XXXIII CNE Cusco. N° 52.

Ramírez-Cruz, A., Llanderal-Cázares. & Racotta, R. 2008. Ovariole structure of the cochineal scale insect, *Dactylopius coccus*. Journal of Insect Science 8(25) 5pp.

Rodríguez, M. 1995. Cariotipo y Patrones de Bandas C en *Bufo espinolosus arequipensis* (Amphibia: Anura). Rev. Ecol. Lat. Am. 2(1):5 –11.

Rodríguez, L., Faúndez, E. & Niemeyer, H. 2005. Mate searching in the scale insect, *Dactylopius coccus* (Hemiptera: Coccoidea: Dactylopiidae). Eur. J. Entomol. 102: 305-306.

Rodríguez, L., Faúndez, E., Seymour, C., Escobar, C., Espinoza, L., Petroutsa, M., Ayres, A. & Niemeyer, H. 2005. Factores bióticos y concentración de Ácido carmínico en la cochinilla (*Dactylopius coccus* Costa) (Homóptera: Dactylopiidae). Agric. Tec. 65(3): 323-329.

Rodríguez, L. & Niemeyer, H. 2000. Evidencias indirectas sobre el origen de la cochinilla *Dactylopius coccus* (Hemiptera: Dactylopiidae). Rev. Chilena Ent. 27: 85-89.

Romero, B. E., Flores, A., Santamaría, E., Salazar, J.C., Ramírez, M. & Pedroza, A. 2006. Identificación, Biología y Adaptación de la Cochinilla silvestre *Dactylopius opuntiae* (Homóptera: Dactylopiidae) a las condiciones ambientales de Bermejillo, Durango. Rev. Chapingo ser. Zonas Áridas. 5(1): 41-48.

Saltzman, M. 1992. Identifying dyes in textiles. American Scientist 80(5): 474-481.

Schrader, F. 1921. The Chromosomes of *Pseudococcus nipæ*. Biol. Bull. 40(5): 259-270.

Siles, M. 1996. Estudio Citogenético en *Capsicum pubescens* Ruiz López & Pavón, "Rocoto". Tesis para optar el grado de Biólogo con mención en Biología Celular y Genética. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima-Perú. 103p.

Triplehorn, C. & Johnson, N. 2005. Borror and De Long's Introduction to the Study of Insects. Seventh Edition. Thompson Brooks/Cole. pp. 270, 288, 326.

Turkoglu, S. & Koca, S. 2002. Karyotype, C- and G-band Patterns and DNA content of *Callimenus* (= *Bradyporus*) *macrogaster macrogaster*. J. Insect Science. 24, 4pp.

Vigueras, A. L., Llanderal-Cázares, C. & Portillo, L. 2005. Cochineal (Hemiptera: Dactylopiidae) production. Scientia-Cucba 7(2): 99-103.

Villasante, A., Abad, J .P. & Méndez-Lago, M. 2007. Centromeres were derived from telomeres during the evolution of the eukaryotic chromosome. PNAS 104(25): 10542-10547.

Wayne, D. 1993. Bioestadística Base para el análisis de las ciencias de la salud. 3^{ra} Edición. Editorial Limusa S.A. México.

Yoshido, A., Bando, H., Yasukochi, Y. & Sahara. K. 2005. The *Bombyx mori* karyotype and the assignment of linkage groups. Genetics 170: 675-685.

9. ANEXOS

9.1 LONGITUD DE LOS CROMOSOMAS METAFÁSICOS de *Dactylopius Coccus* COSTA

PLACA N° 1

N° DE CROMOSOMA	LONGITUD(μm)
1	0,73
2	0,75
3	1,0
4	0,71
5	0,82
6	0,90
7	1,77
8	1,0
9	1,68
10	1,64
11	1,73
12	1,37
13	1,33
14	0,73
15	1,5
16	1,5

ESTABLECIMIENTO DE LOS HOMÓLOGOS: (Σ Cn = 9,58 μm)

PARES HOMÓLOGOS (μm)	LONGITUD PROMEDIO (μm)	LONGITUD RELATIVA (%)
7^11	1,75	18,27
9^10	1,66	14,08
15^16	1,5	17,33
12^13	1,35	15,66
3^8	1,0	10,44
14^1	0,73	7,62
2^4	0,73	7,62
5^6	0,86	8,98

PLACA N° 2

N° DE CROMOSOMA	LONGITUD
1	1,54
2	1,64
3	1,36
4	1,51
5	1,37
6	0,89
7	1,0
8	1,0
9	1,48
10	1,60
11	0,92
12	1,46
13	0,82
14	0,87
15	0,65
16	0,63

ESTABLECIMIENTO DE LOS HOMÓLOGOS:
(Σ Cn = 9,37 μ m)

PARES HOMÓLOGOS (μ m)	LONGITUD PROMEDIO (μ m)	LONGITUD RELATIVA (%)
2^10	1,62	17,29
1^4	1,525	16,28
9^12	1,47	15,69
3^5	1,365	14,56
7^8	1,00	10,67
6^11	0,905	9,66
13^14	0,845	9,02
15^16	0,64	6,83

PLACA N° 3

N° DE CROMOSOMA	LONGITUD
1	2,25
2	2,19
3	1,52
4	1,49
5	1,62
6	1,60
7	1,41
8	1,37
9	1,46
10	1,48
11	1,58
12	1,62
13	1,51
14	1,48
15	1,53
16	1,53

ESTABLECIMIENTO DE LOS HOMÓLOGOS:
($\Sigma Cn = 12,82 \mu m$)

PARES HOMÓLOGOS (μm)	LONGITUD PROMEDIO (μm)	LONGITUD RELATIVA (%)
1^2	2,22	17,32
5^6	1,61	12,56
11^12	1,60	12,48
15^16	1,53	11,93
3^4	1,505	11,74
13^14	1,495	11,66
9^10	1,47	11,47
7^8	1,39	10,84

PLACA N° 4

N° DE CROMOSOMA	LONGITUD
1	1,49
2	0,68
3	0,9
4	0,72
5	0,62
6	0,75
7	1,51
8	0,75
9	0,76
10	0,82
11	0,63
12	0,70
13	0,73
14	0,58
15	0,67
16	0,77

**ESTABLECIMIENTO DE LOS HOMÓLOGOS:
(Σ Cn = 6,54 μ m)**

PARES HOMÓLOGOS (μm)	LONGITUD PROMEDIO (μm)	LONGITUD RELATIVA (%)
1^7	1,50	22,94
3^10	0,86	13,15
9^16	0,765	11,70
6^8	0,75	11,47
12^13	0,715	10,93
2^4	0,7	10,70
11^15	0,65	9,94
14^5	0,6	9,17

PLACA N° 5

N° DE CROMOSOMA	LONGITUD
1	0,71
2	0,81
3	1,39
4	1,37
5	1,46
6	1,50
7	0,75
8	0,61
9	0,81
10	0,67
11	0,75
12	0,64
13	0,75
14	0,78
15	0,68
16	0,73

ESTABLECIMIENTO DE LOS HOMÓLOGOS:
($\Sigma Cn = 7,205 \mu m$)

PARES HOMÓLOGOS (μm)	LONGITUD PROMEDIO (μm)	LONGITUD RELATIVA (%)
5^6	1,48	20,54
3^4	1,38	19,15
14^9	0,795	11,03
2^11	0,78	10,83
13^7	0,75	10,41
1^16	0,72	10,00
10^15	0,675	9,37
8^12	0,625	8,67

PLACA N° 6

N° DE CROMOSOMA	LONGITUD
1	1,00
2	0,82
3	0,77
4	1,42
5	1,40
6	0,80
7	1,44
8	1,50
9	0,81
10	1,3
11	0,98
12	0,75
13	1,50
14	0,77
15	0,89
16	0,89

**ESTABLECIMIENTO DE LOS HOMÓLOGOS:
(Σ Cn = 8,52 μ m)**

PARES HOMÓLOGOS (μm)	LONGITUD PROMEDIO (μm)	LONGITUD RELATIVA (%)
8^13	1,50	17,61
4^7	1,43	16,78
5^10	1,35	15,85
1^11	0,99	11,62
15^16	0,89	10,45
2^9	0,815	9,56
14^6	0,785	9,21
3^12	0,76	8,92

PLACA N° 7

N° DE CROMOSOMA	LONGITUD
1	1,54
2	0,88
3	1,62
4	1,60
5	1,00
6	1,00
7	1,43
8	1,50
9	1,50
10	1,44
11	1,82
12	0,82
13	1,80
14	2,10
15	2,00
16	1,64

**ESTABLECIMIENTO DE LOS HOMÓLOGOS:
($\Sigma Cn = 12,295 \mu m$)**

PARES HOMÓLOGOS (μm)	LONGITUD PROMEDIO (μm)	LONGITUD RELATIVA (%)
14^15	2,5	20,33
11^13	1,81	14,72
3^16	1,63	13,26
1^4	1,57	12,77
8^9	1,50	12,20
7^10	1,435	11,68
5^6	1,00	8,13
2^12	0,85	6,91

PLACA N° 8

N° DE CROMOSOMA	LONGITUD
1	1,68
2	1,96
3	1,70
4	2,20
5	1,60
6	0,97
7	1,62
8	0,91
9	0,94
10	1,30
11	0,96
12	1,46
13	0,89
14	0,87
15	1,34
16	1,42

ESTABLECIMIENTO DE LOS HOMÓLOGOS:
($\Sigma Cn = 10,91 \mu m$)

PARES HOMÓLOGOS (μm)	LONGITUD PROMEDIO (μm)	LONGITUD RELATIVA (%)
2^4	2,08	19,07
1^3	1,69	15,49
5^7	1,61	14,76
12^16	1,44	13,19
10^15	1,32	12,09
6^11	0,965	8,85
8^9	0,925	8,48
13^14	0,88	8,07

PLACA N° 9

N° DE CROMOSOMA	LONGITUD
1	1,15
2	0,77
3	0,84
4	1,06
5	1,20
6	0,64
7	0,76
8	0,88
9	1,30
10	0,82
11	0,72
12	1,40
13	1,10
14	0,76
15	0,88
16	0,80

ESTABLECIMIENTO DE LOS HOMÓLOGOS:
($\Sigma Cn = 7,515 \mu m$)

PARES HOMÓLOGOS (μm)	LONGITUD PROMEDIO (μm)	LONGITUD RELATIVA (%)
9^12	1,35	17,96
1^5	1,15	15,30
4^13	1,08	14,37
2^15	0,88	11,71
3^10	0,23	11,05
2^16	0,785	10,45
7^14	0,76	10,11
11^6	0,68	9,05

PLACA N° 10

N° DE CROMOSOMA	LONGITUD
1	1,81
2	1,42
3	1,37
4	0,74
5	1,75
6	0,80
7	1,77
8	0,75
9	0,75
10	1,00
11	1,70
12	1,00
13	0,75
14	0,70
15	1,38
16	1,48

ESTABLECIMIENTO DE LOS HOMÓLOGOS:
($\Sigma Cn = 9,585 \mu m$)

PARES HOMÓLOGOS (μm)	LONGITUD PROMEDIO (μm)	LONGITUD RELATIVA (%)
1^7	1,79	18,68
5^11	1,725	17,99
2^16	1,45	15,13
3^15	1,375	14,35
12^10	1,00	10,43
6^13	0,775	8,09
8^9	0,75	7,82
4^14	0,72	7,51

PLACA N° 11

N° DE CROMOSOMA	LONGITUD
1	1,54
2	0,75
3	1,46
4	1,16
5	1,50
6	1,79
7	1,52
8	1,53
9	1,82
10	0,98
11	0,71
12	1,82
13	1,44
14	1,76
15	0,64
16	0,64

**ESTABLECIMIENTO DE LOS HOMÓLOGOS:
($\Sigma Cn = 10,515 \mu m$)**

PARES HOMÓLOGOS (μm)	LONGITUD PROMEDIO (μm)	LONGITUD RELATIVA (%)
9^12	1,82	17,31
6^14	1,76	16,74
7^8	1,525	14,49
1^5	1,52	14,46
3^13	1,45	13,79
10^4	1,07	10,18
2^11	0,73	6,94
15^16	0,64	6,09

PLACA N° 12

N° DE CROMOSOMA	LONGITUD
1	1,51
2	1,62
3	0,89
4	1,36
5	0,68
6	0,92
7	0,72
8	1,20
9	0,85
10	0,89
11	1,48
12	1,39
13	1,58
14	1,49
15	1,55
16	1,00

**ESTABLECIMIENTO DE LOS HOMÓLOGOS:
($\Sigma Cn = 9,565$)**

PARES HOMÓLOGOS (μm)	LONGITUD PROMEDIO (μm)	LONGITUD RELATIVA (%)
2^13	1,60	16,73
1^15	1,53	15,99
14^11	1,485	15,53
4^12	1,375	14,38
16^8	1,100	11,50
3^6	0,905	9,46
9^10	0,87	9,09
7^5	0,70	7,32

PLACA N° 13

N° DE CROMOSOMA	LONGITUD
1	0,58
2	1,50
3	1,37
4	1,30
5	1,10
6	0,98
7	0,96
8	1,43
9	1,72
10	1,72
11	0,76
12	0,88
13	0,78
14	0,54
15	1,74
16	1,66

**ESTABLECIMIENTO DE LOS HOMÓLOGOS:
(Σ Cn = 9,51 μ m)**

PARES HOMÓLOGOS (μm)	LONGITUD PROMEDIO (μm)	LONGITUD RELATIVA (%)
9^10	1,72	16,73
15^16	1,70	15,99
2^8	1,465	15,53
3^4	1,335	14,38
5^6	1,04	11,50
7^12	0,78	9,46
11^13	0,77	9,09
1^14	0,56	7,32

PLACA N° 14

N° DE CROMOSOMA	LONGITUD
1	1,10
2	0,92
3	0,79
4	0,70
5	0,75
6	1,20
7	0,64
8	0,93
9	0,87
10	1,26
11	0,89
12	1,30
13	0,77
14	0,82
15	0,94
16	0,87

ESTABLECIMIENTO DE LOS HOMÓLOGOS:
($\Sigma Cn = 7,375 \mu m$)

PARES HOMÓLOGOS (μm)	LONGITUD PROMEDIO (μm)	LONGITUD RELATIVA (%)
6^12	1,25	16,95
1^10	1,18	16,00
2^15	0,93	12,61
8^11	0,91	12,34
9^16	0,87	11,80
3^14	0,805	10,91
5^13	0,76	10,31
4^7	0,67	9,08

PLACA N° 15

N° DE CROMOSOMA	LONGITUD
1	1,62
2	0,94
3	1,37
4	0,68
5	0,87
6	0,78
7	1,00
8	0,76
9	0,82
10	1,37
11	0,87
12	1,62
13	0,70
14	0,84
15	0,75
16	0,84

ESTABLECIMIENTO DE LOS HOMÓLOGOS:
($\Sigma Cn = 7,945 \mu m$)

PARES HOMÓLOGOS (μm)	LONGITUD PROMEDIO (μm)	LONGITUD RELATIVA (%)
1^12	1,62	20,39
3^10	1,37	17,24
2^7	0,97	12,21
16^14	0,87	10,95
5^11	0,87	10,95
6^9	0,80	10,08
8^15	0,755	9,50
4^13	0,69	8,68

PLACA N° 16

N° DE CROMOSOMA	LONGITUD
1	0,92
2	1,02
3	0,99
4	0,77
5	0,84
6	0,71
7	1,00
8	0,90
9	0,89
10	1,65
11	1,63
12	0,65
13	1,02
14	0,77
15	0,80
16	0,90

**ESTABLECIMIENTO DE LOS HOMÓLOGOS:
(Σ Cn = 7,73 μ m)**

PARES HOMÓLOGOS (μm)	LONGITUD PROMEDIO (μm)	LONGITUD RELATIVA (%)
10^11	1,64	21,22
2^13	1,02	13,20
3^7	0,995	12,87
1^16	0,91	11,77
8^9	0,895	11,58
5^15	0,82	10,61
4^14	0,77	9,96
6^12	0,68	8,79

PLACA N° 17

N° DE CROMOSOMA	LONGITUD
1	1,75
2	0,94
3	1,77
4	1,70
5	1,24
6	1,58
7	0,62
8	0,62
9	0,74
10	1,45
11	1,30
12	1,64
13	0,90
14	1,41
15	1,70
16	0,70

ESTABLECIMIENTO DE LOS HOMÓLOGOS:
($\Sigma Cn = 10,01 \mu m$)

PARES HOMÓLOGOS (μm)	LONGITUD PROMEDIO (μm)	LONGITUD RELATIVA (%)
1^3	1,76	17,58
4^15	1,70	16,98
6^12	1,61	16,09
10^14	1,41	14,09
5^11	1,27	12,69
2^13	0,92	9,19
9^16	0,72	7,19
7^8	0,62	6,19

PLACA N° 18

N° DE CROMOSOMA	LONGITUD
1	1,37
2	1,50
3	0,90
4	0,94
5	0,78
6	1,20
7	0,76
8	0,98
9	0,62
10	1,10
11	0,70
12	1,50
13	1,50
14	1,48
15	1,05
16	1,37

ESTABLECIMIENTO DE LOS HOMÓLOGOS:
($\Sigma Cn = 8,875 \mu m$)

PARES HOMÓLOGOS (μm)	LONGITUD PROMEDIO (μm)	LONGITUD RELATIVA (%)
13^2	1,50	16,90
14^12	1,49	16,78
1^16	1,37	15,44
6^10	1,15	12,95
2^15	1,015	11,44
3^4	0,92	10,37
7^5	0,77	8,68
9^11	0,66	7,44

PLACA N° 19

N° DE CROMOSOMA	LONGITUD
1	0,62
2	0,85
3	0,87
4	0,85
5	0,80
6	0,77
7	0,79
8	0,94
9	0,62
10	0,92
11	0,92
12	0,85
13	0,94
14	0,76
15	0,74
16	0,82

ESTABLECIMIENTO DE LOS HOMÓLOGOS:
(Σ Cn = 6,53 μ m)

PARES HOMÓLOGOS (μ m)	LONGITUD PROMEDIO (μ m)	LONGITUD RELATIVA (%)
8^13	0,94	14,40
10^11	0,92	14,09
3^4	0,86	13,17
2^12	0,85	13,02
5^16	0,81	12,40
6^7	0,78	11,94
14^15	0,75	11,49
1^9	0,62	9,49

PLACA N° 20

N° DE CROMOSOMA	LONGITUD
1	1,58
2	1,42
3	1,73
4	1,71
5	2,54
6	1,73
7	2,58
8	2,60
9	1,64
10	2,48
11	1,77
12	1,00
13	1,48
14	1,44
15	1,62
16	0,94

ESTABLECIMIENTO DE LOS HOMÓLOGOS:
($\Sigma Cn = 14,13 \mu m$)

PARES HOMÓLOGOS (μm)	LONGITUD PROMEDIO (μm)	LONGITUD RELATIVA (%)
7^8	2,59	18,33
5^10	2,51	17,76
6^11	1,75	12,38
3^4	1,72	12,17
9^15	1,63	11,54
1^2	1,50	10,62
13^14	1,46	10,33
12^16	0,97	6,87

9.2 PLACAS METAFÁSICAS UTILIZADAS AL MEDIR LOS CROMOSOMAS DE

Dactylopius coccus Costa

PLACA N° 01

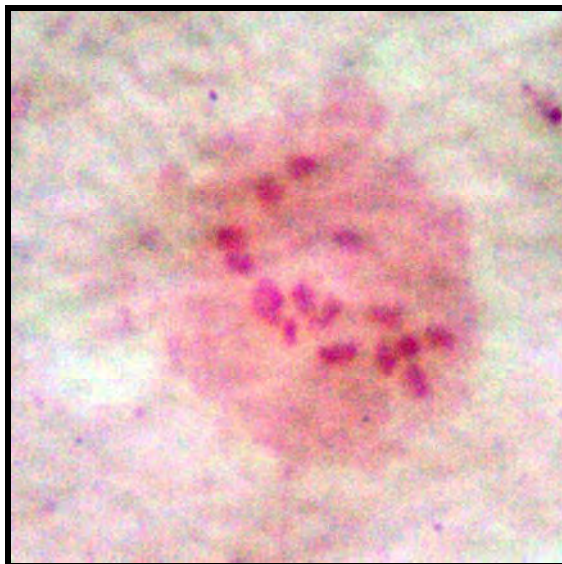


Fig. 28

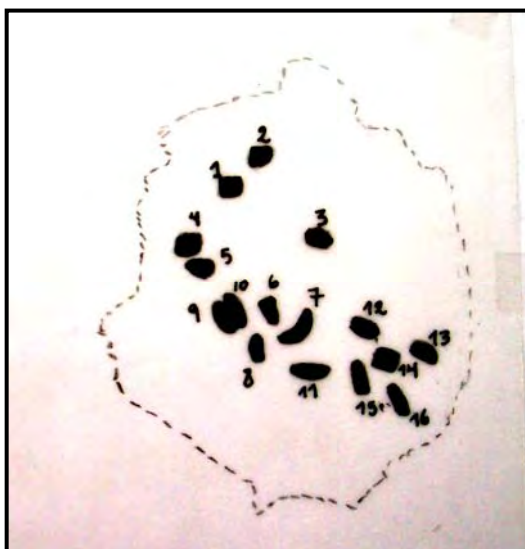


Fig. 29

Fig. 28: Fotografía de la placa metafásica 01.

Fig. 29: Representación Esquemática de la placa metafásica 01.

PLACA N° 02

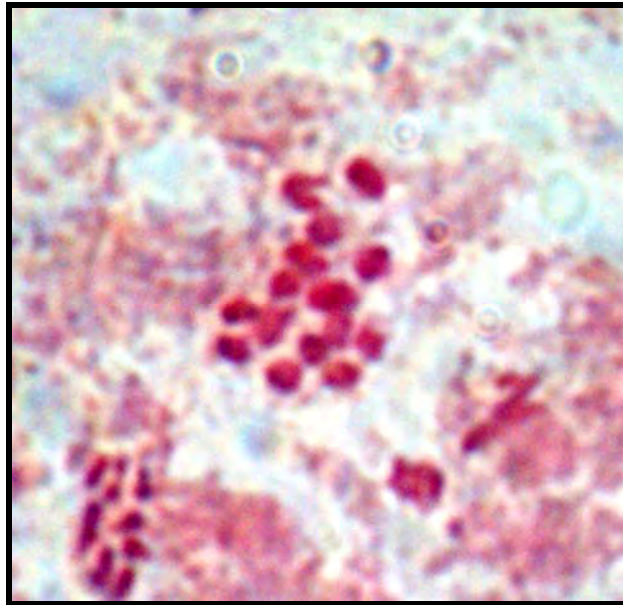


Fig. 30



Fig. 31

Fig. 30: Fotografía de la placa metafásica 03.

Fig. 31: Representación Esquemática de la placa metafásica 03. La flecha roja indica la presencia de ligaciones cromosómicas.

PLACA N° 03

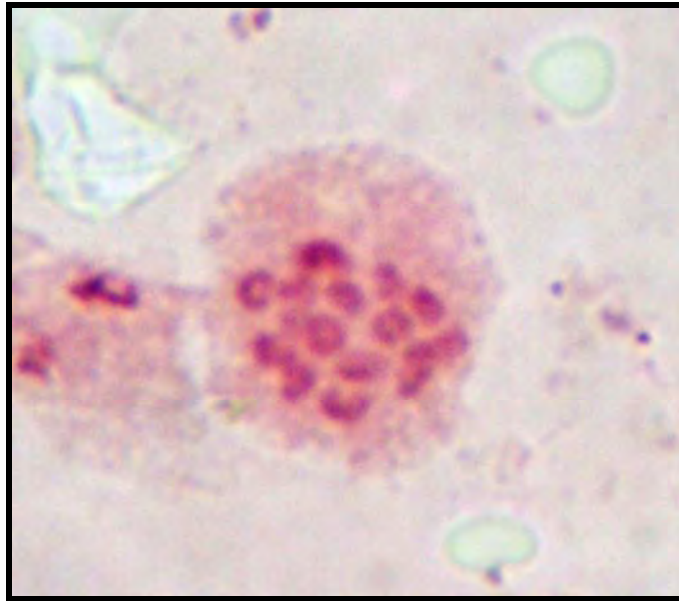


Fig. 32

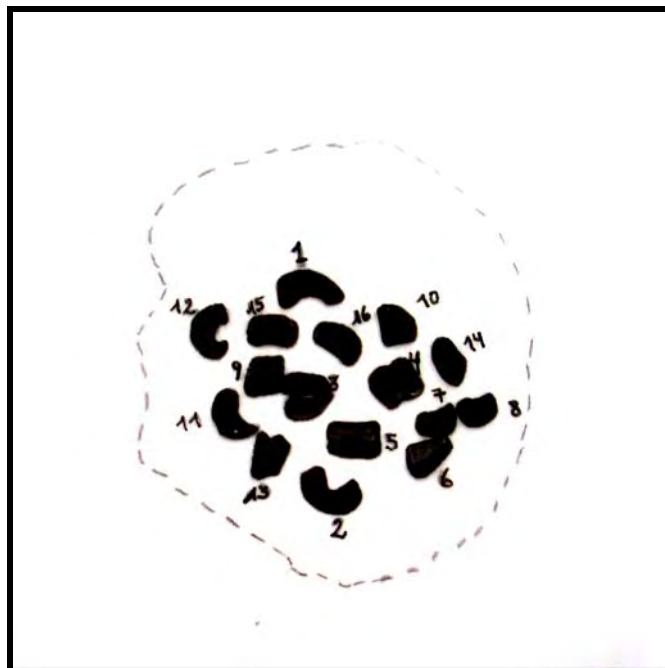


Fig. 33

Fig. 32: Fotografía de la placa metafásica 03.

Fig. 33: Representación Esquemática de la placa metafásica 03.

PLACA N° 04

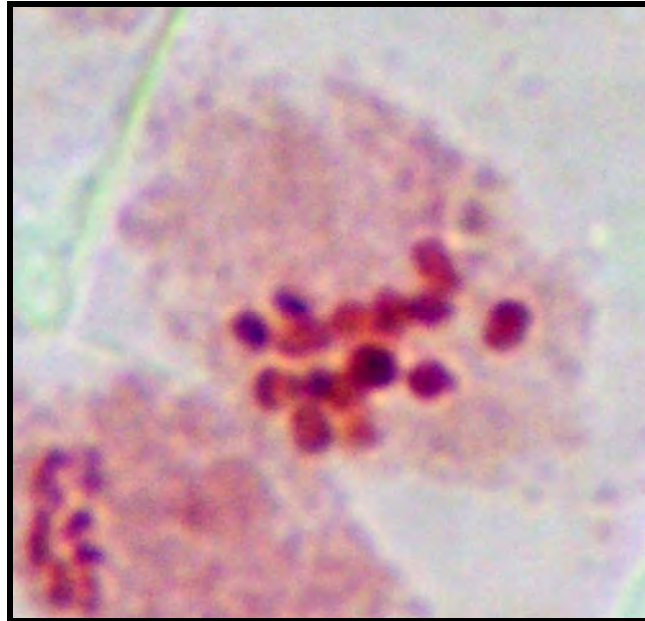


Fig. 34



Fig. 35

Fig. 34: Fotografía de la placa metafásica 04.

Fig. 35: Representación Esquemática de la placa metafásica 04. La flecha roja indica la presencia de ligaciones cromosómicas.

PLACA N° 05

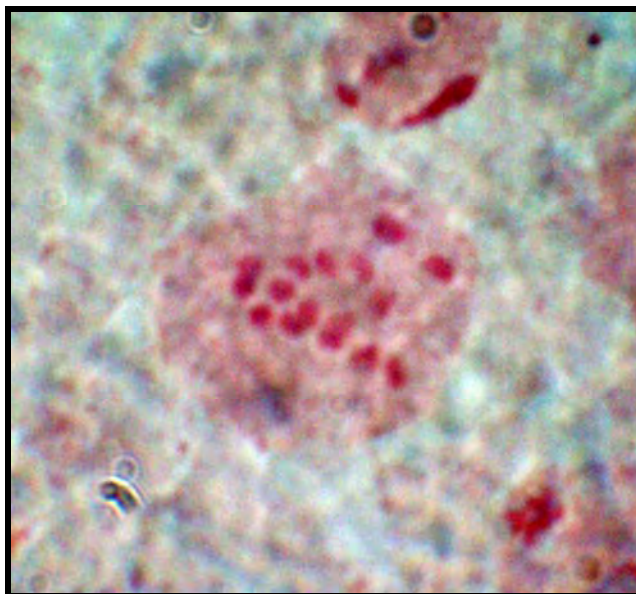


Fig. 36

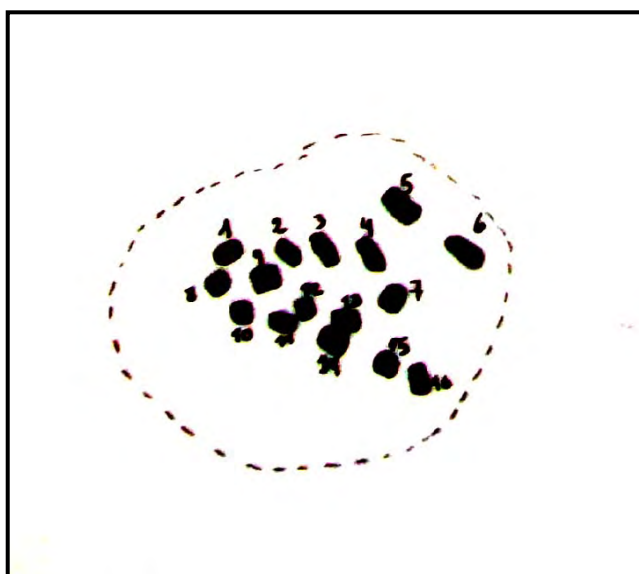


Fig. 37

Fig. 36: Fotografía de la placa metafásica 03.

Fig. 37: Representación Esquemática de la placa metafásica 03.

PLACA N° 06

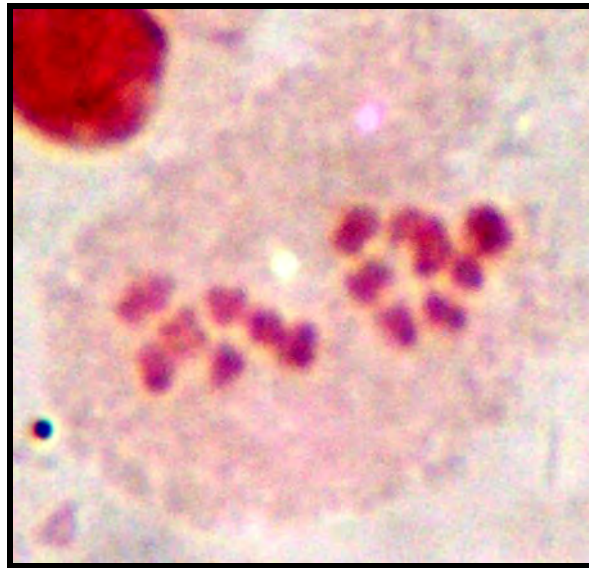


Fig. 38

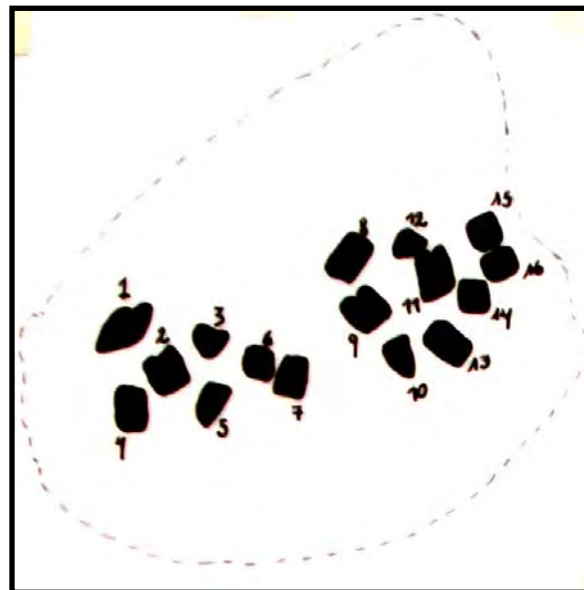


Fig. 39

Fig. 38: Fotografía de la placa metafásica 06.

Fig. 39: Representación Esquemática de la placa metafásica 06.

PLACA N° 07

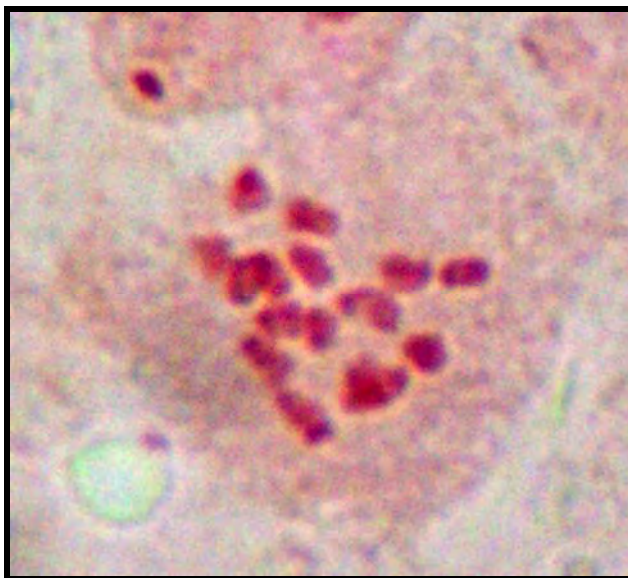


Fig. 40

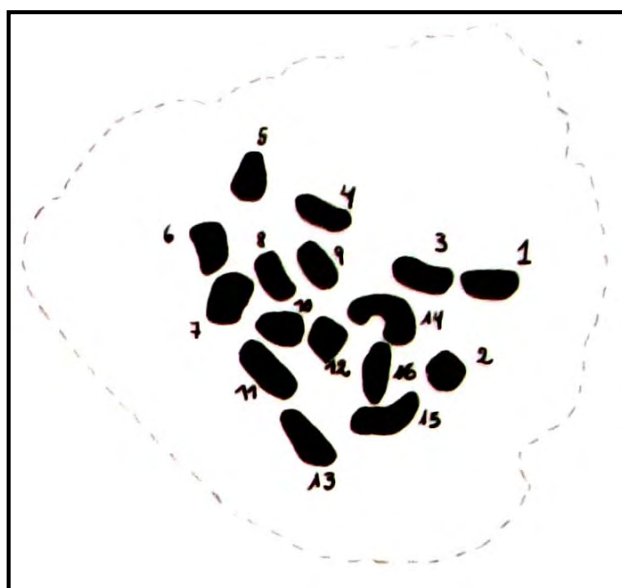


Fig. 41

Fig. 40: Fotografía de la placa metafásica 07.

Fig. 41: Representación Esquemática de la placa metafásica 07.

PLACA N° 08

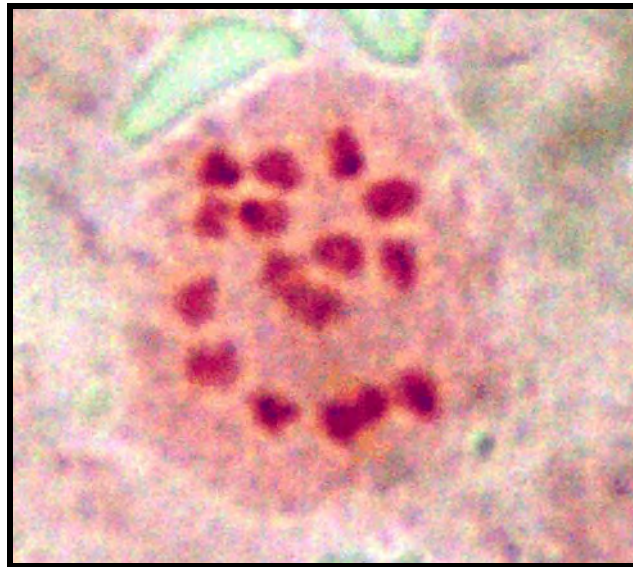


Fig. 42

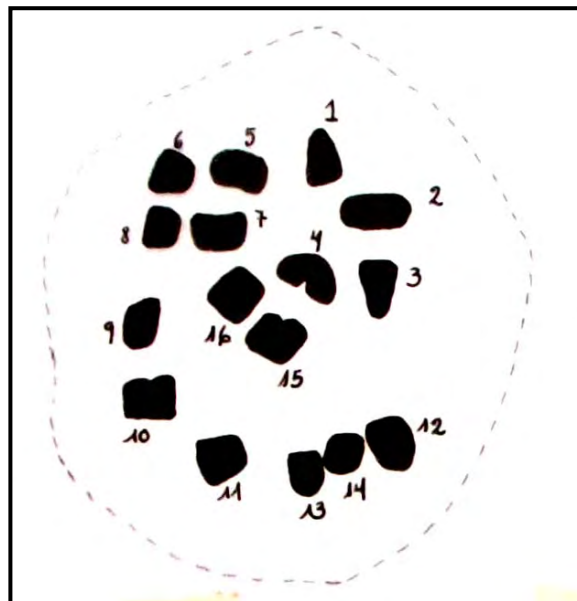


Fig. 43

Fig. 42: Fotografía de la placa metafásica 08.

Fig. 43: Representación Esquemática de la placa metafásica 08.

PLACA N° 09

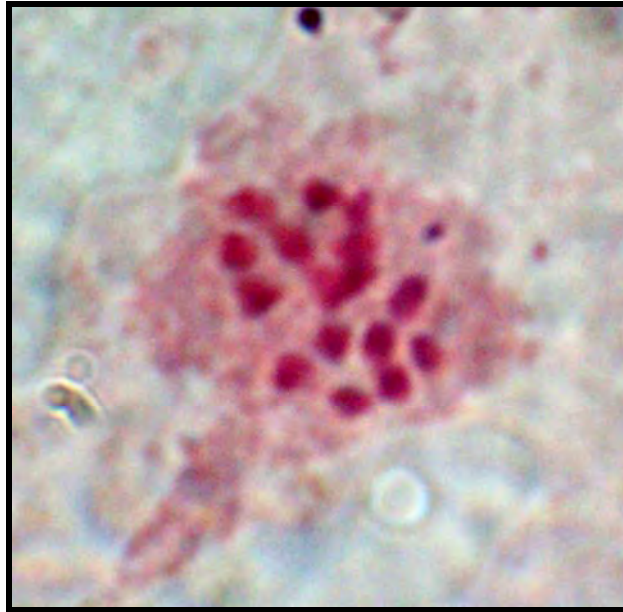


Fig. 44

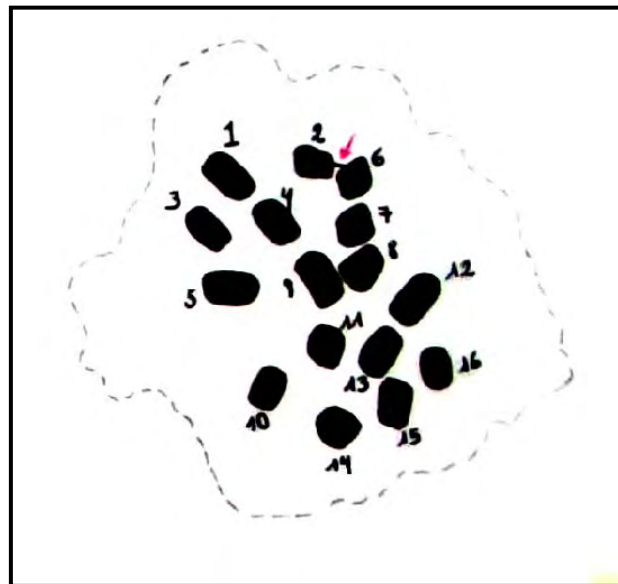


Fig. 45

Fig. 44: Fotografía de la placa metafásica 03.

Fig. 45: Representación Esquemática de la placa metafásica 03. La flecha roja indica la presencia de ligaciones cromosómicas

PLACA N° 10

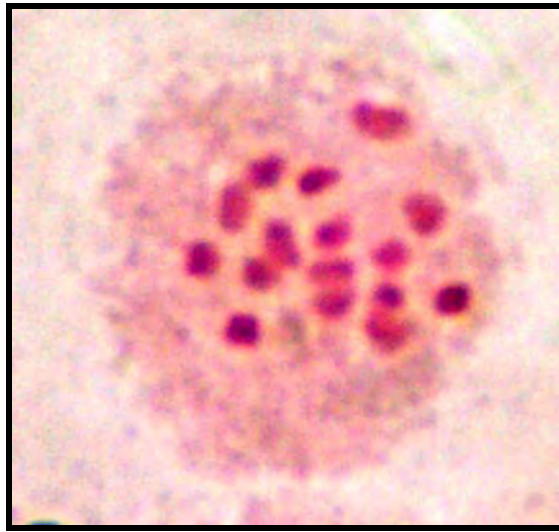


Fig. 46



Fig. 47

Fig. 46: Fotografía de la placa metafásica 10.

Fig. 47: Representación Esquemática de la placa metafásica 10.

PLACA N° 11

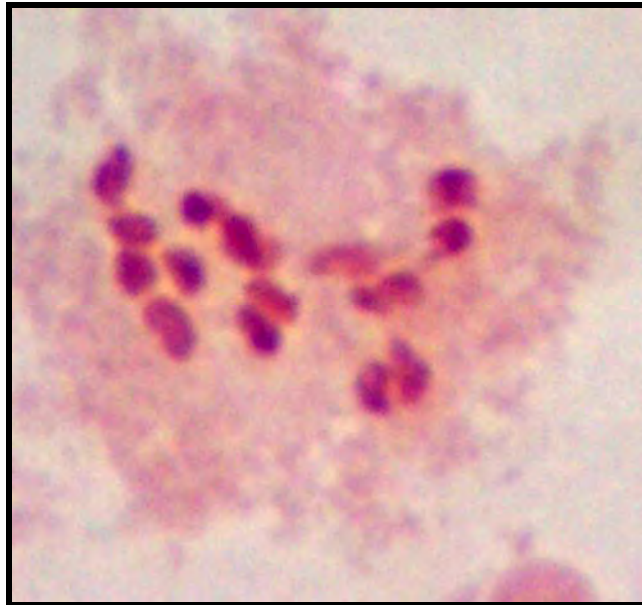


Fig. 48

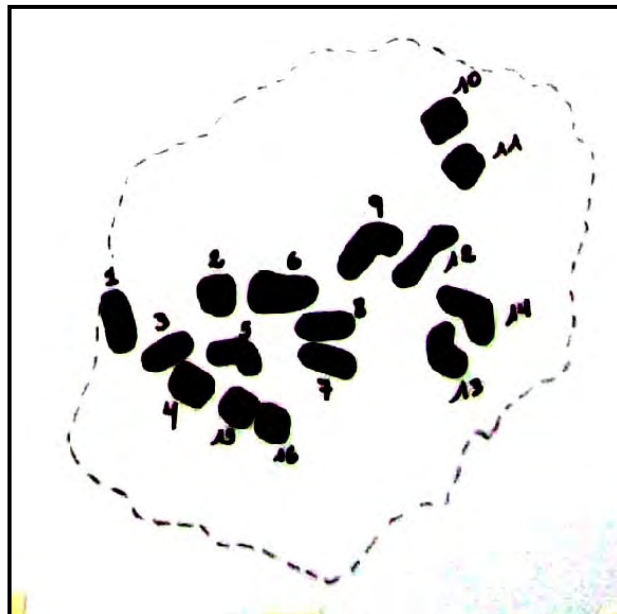


Fig.49

Fig. 48: Fotografía de la placa metafásica 11.

Fig. 49: Representación Esquemática de la placa metafásica 11.

PLACA N° 12

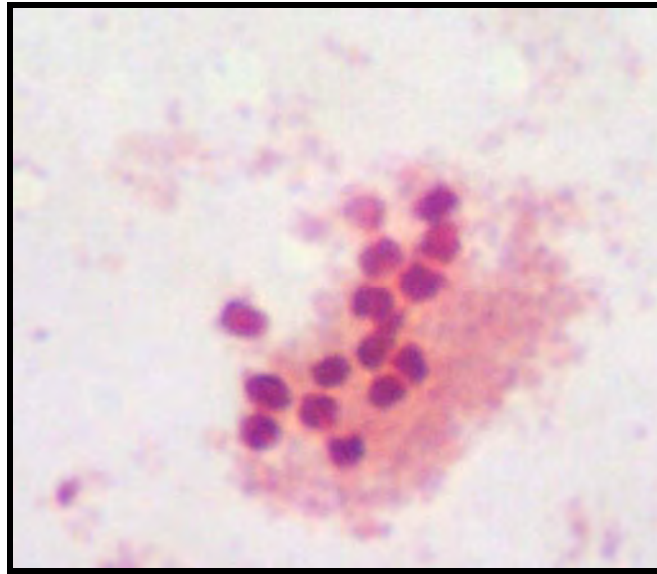


Fig. 50

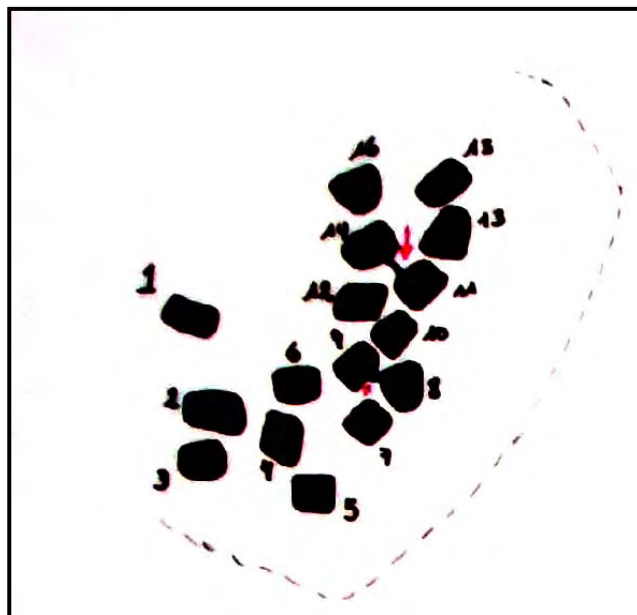


Fig. 51

Fig. 50: Fotografía de la placa metafásica 04.

Fig. 51: Representación Esquemática de la placa metafásica 11. Las flecha rojas indican, la presencia de ligaciones cromosómicas.

PLACA N° 13

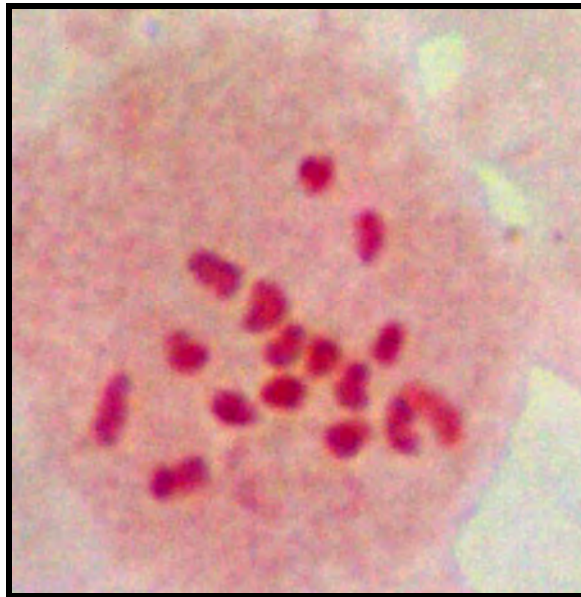


Fig. 52



Fig. 53

Fig. 52: Fotografía de la placa metafásica 04.

Fig. 53: Representación Esquemática de la placa metafásica 04

PLACA N° 14

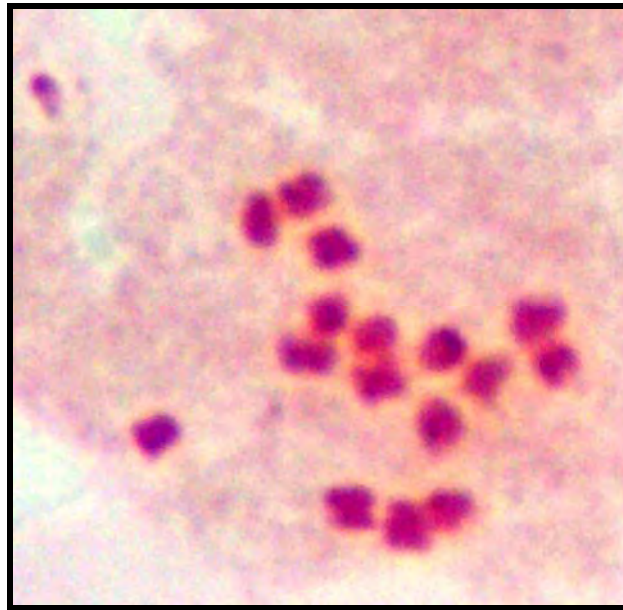


Fig. 54

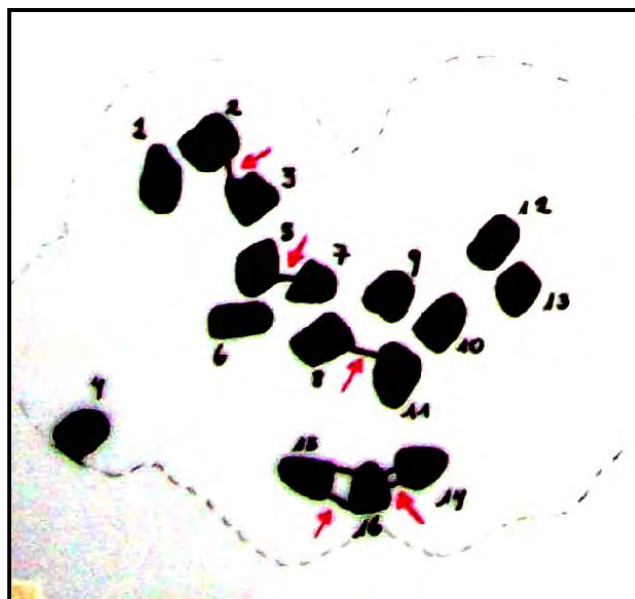


Fig. 55

Fig. 54: Fotografía de la placa metafásica 04.

Fig. 55: Representación Esquemática de la placa metafásica 04.

PLACA N° 15

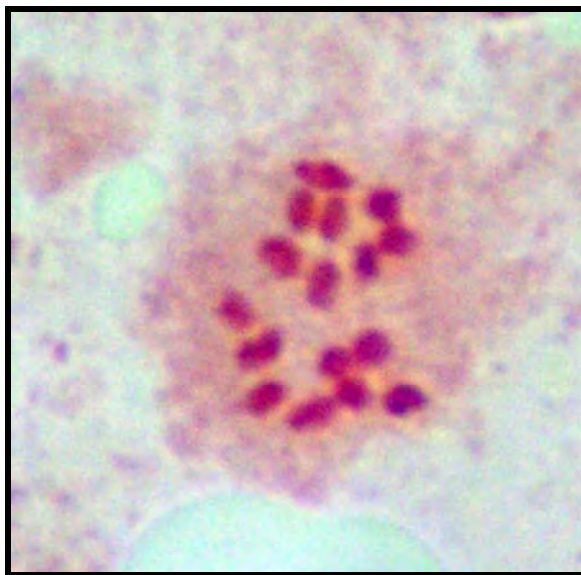


Fig. 56



Fig. 57

Fig. 56: Fotografía de la placa metafásica 04.

Fig. 57: Representación Esquemática de la placa metafásica 04.

PLACA N° 16

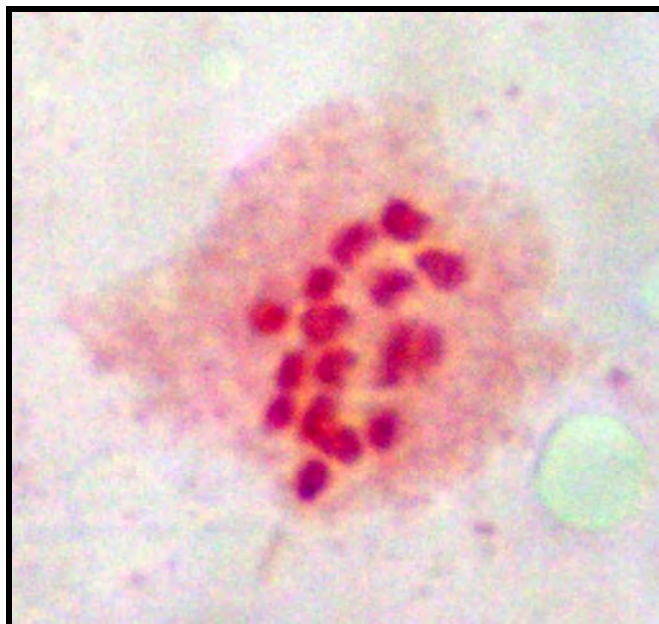


Fig. 58

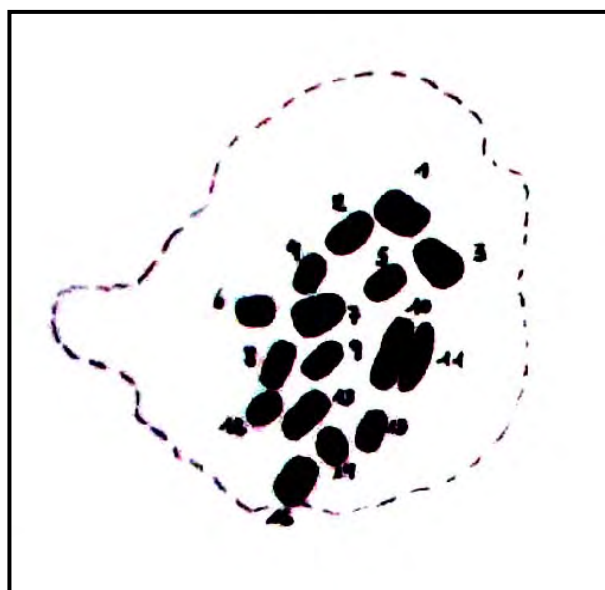


Fig. 59

Fig. 58: Fotografía de la placa metafásica 04.

Fig. 59: Representación Esquemática de la placa metafásica 04.

PLACA N° 17

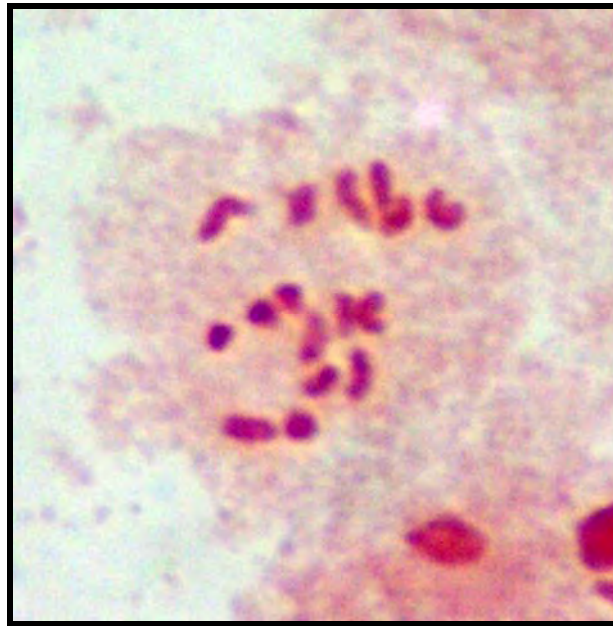


Fig. 60



Fig. 61

Fig. 60: Fotografía de la placa metafásica 04.

Fig. 61: Representación Esquemática de la placa metafásica 04.

PLACA N° 18

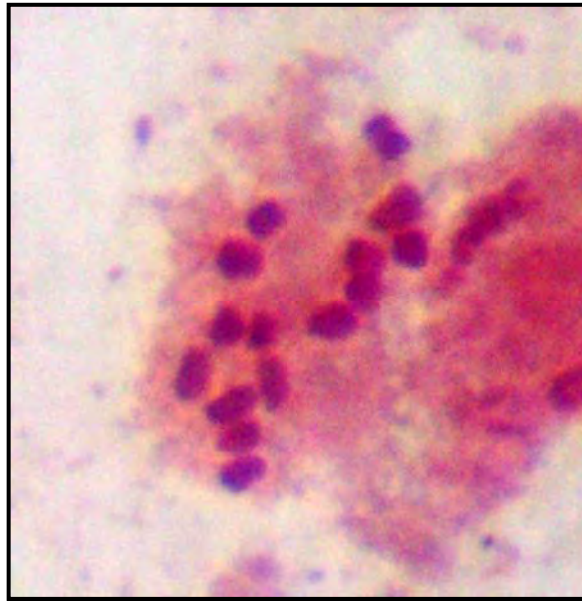


Fig. 62



Fig. 63

Fig. 62: Fotografía de la placa metafásica 03.

Fig. 63: Representación Esquemática de la placa metafásica 03.

PLACA N° 19

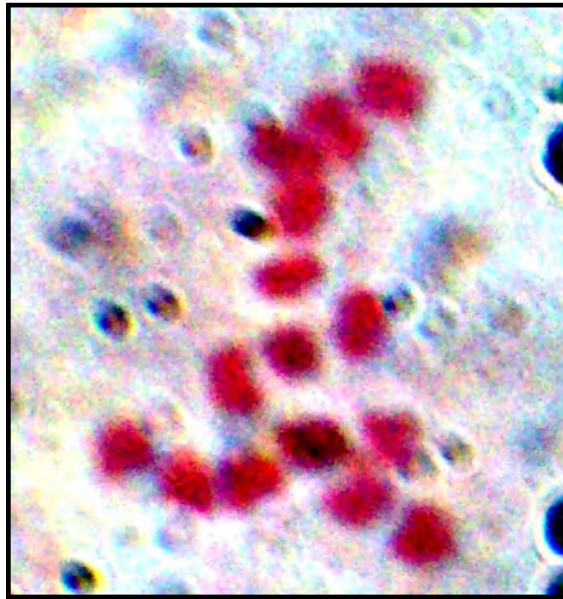


Fig. 64



Fig. 65

Fig. 64: Fotografía de la placa metafásica 03.

Fig. 65: Representación Esquemática de la placa metafásica 03.

PLACA N° 20

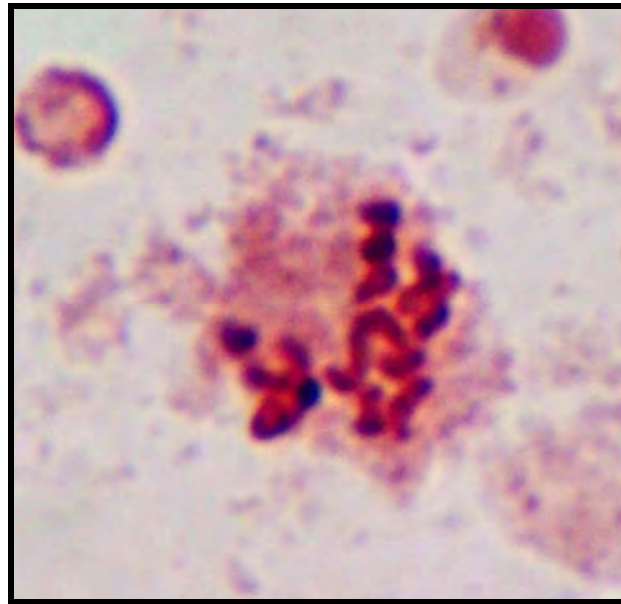


Fig. 66

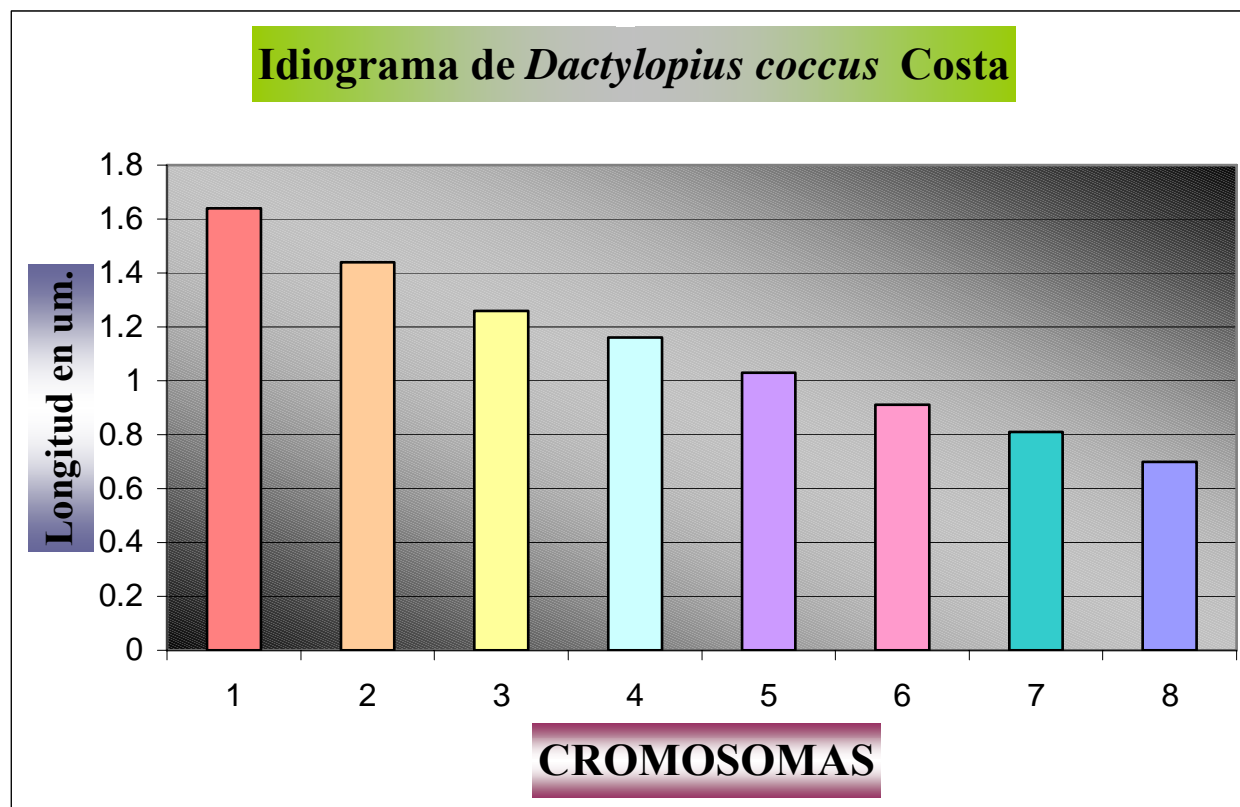


Fig. 67

Fig. 66: Fotografía de la placa metafásica 03.

Fig. 67: Representación Esquemática de la placa metafásica 03.

9.3 IDIOGRAMA de *Dactylopius coccus* Costa



9.4 FUSIÓN Y HETEROCROMATINIZACIÓN EN LOS CROMOSOMAS DE *Dactylopius coccus* Costa

PLACA N° 21

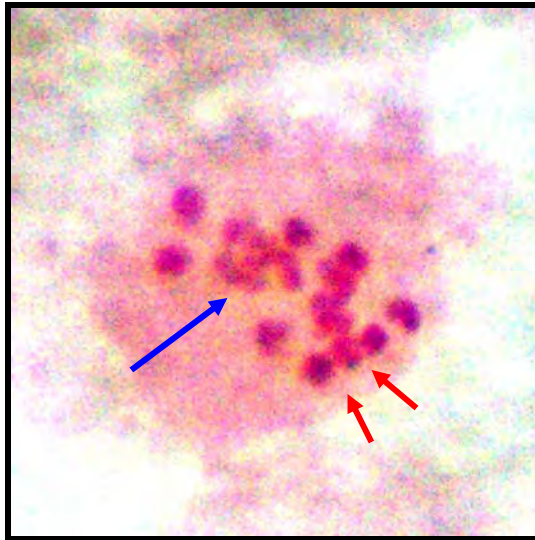


Fig. 68: Célula en Metafase típica. La flecha azul, indica la fusión entre cromosomas. Las flechas rojas indican la presencia de ligaciones cromosómicas

PLACA N° 22

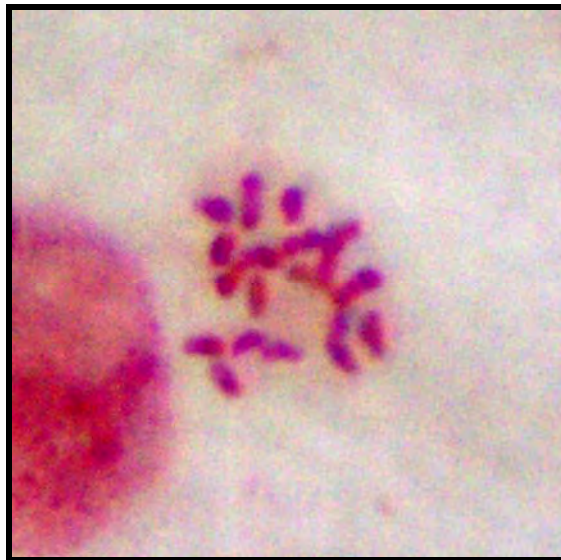


Fig. 69 Cromosomas Metafásicos con atracción en las regiones teloméricas.

PLACA N° 23



Fig. 70: Cromosomas Prometafásicos de Embrión ♀. Las flechas azules, indican la fusión entre cromosomas. La condensación es similar en todos los cromosomas.

PLACA N° 24

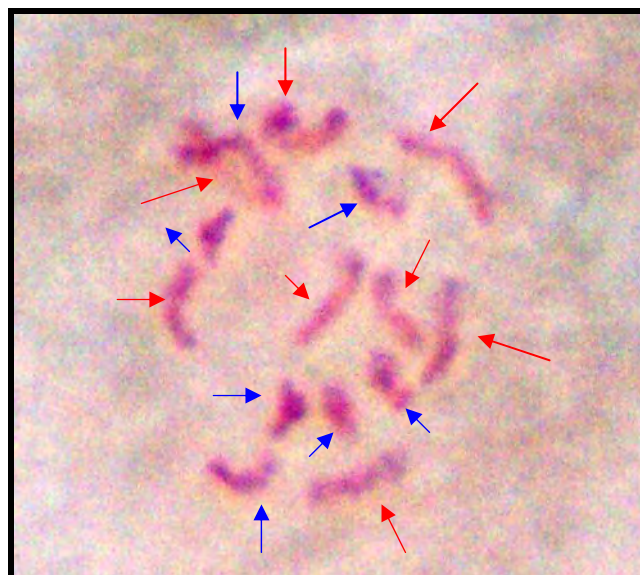


Fig. 71: Cromosomas Prometafásicos de Embrión ♂. Las flechas azules indican los **H**. Las flechas rojas indican los **E**. La condensación es diferencial entre los cromosomas.

9.5 *Dactylopius coccus* Costa en el Laboratorio

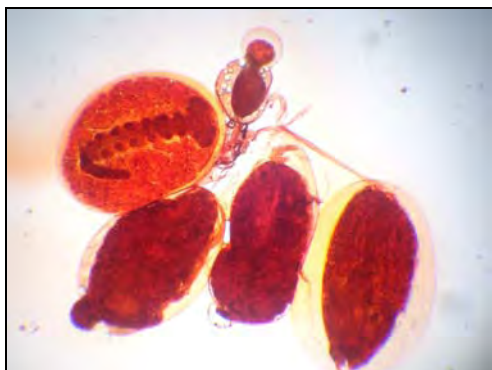


Fig.72 Embriones de *Dactylopius coccus* C.



Fig. 73 Ninfa de *Dactylopius coccus* C.

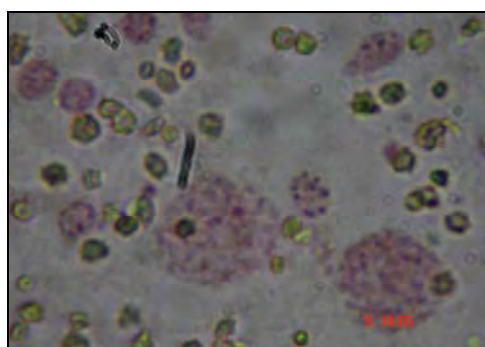


Fig. 74 Si la lisis es excesiva el exoesqueleto en formación se desintegrará, generando suciedad en las preparaciones citológicas.

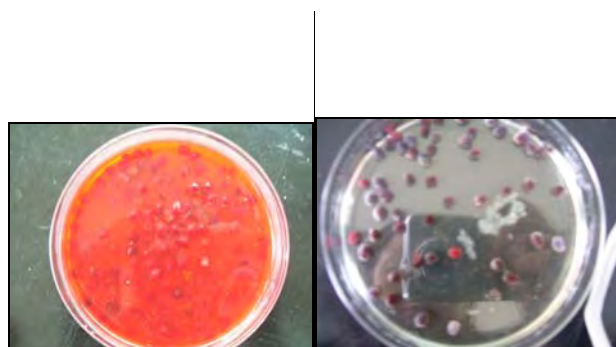


Fig. 75 lisis excesiva

Fig. 76 lisis adecuada



Fig. 77 Vista dorsal de hembra de *D. coccus*



Fig. 78 Vista ventral de hembra de *D. coccus*



Fig. 79 Vista ventral de macho de *D. coccus*

9.6 MAPA GEOGRÁFICO DE SAN BARTOLOMÉ- HUAROCHIRÍ- LIMA



Fig. 80 MAPA DE HUAROCHIRI-LIMA



Fig. 81 MAPA San Bartolomé-HUAROCHIRÍ



Fig.82 Zona de colecta de “la cochinilla del carmín”

9.7 *Dactylopius coccus* Costa en San Bartolomé



Fig.83 Pencas de *Opuntia* sp. infestadas con *D. coccus*



Fig.84 Colectando cochinilla



Fig.85 Cladodio de *Opuntia* sp. con cochinilla en reproducción



Fig.85 Oviposición de *D. coccus*

10. ADDENDUM

A los cóccidos se les conoce también como insectos escamosos debido a la coccerina que cubre sus cuerpos y que comúnmente son llamadas “escamas” (Gullan & Korztarab, 1997).

La similitud morfológica en los cóccidos es tan alta que ha llevado en más de una ocasión a tener problemas a la hora de ser clasificados. Así Gullan & Cook (1997) generan expectativas sobre la relación filogenética entre los Dactylopiidae y los Eriococcidae sin embargo pese a las similitudes entre ambos grupos la primera familia con su único género *Dactylopius* es reconocido reconocido como una familia monofilética y aprobado oficialmente por la comisión internacional de nomenclatura zoológica (1983). Por ello, los mismos autores, para evitar mayores confusiones, sugieren finalmente que se mantengan los nombres Eriococcidae y Dactylopiidae por separado.

En el proceso evolutivo los cóccidos han desarrollado especializaciones muy diferentes al resto de los Heteróptera, tales como:

- ✓ La reducción en la forma y movilidad.
- ✓ La reducción o pérdida de estructuras, como sus pequeñas patas.
- ✓ El desarrollo de varios mecanismos para proteger sus huevos donde la hembra retiene los huevos dentro de su cuerpo previo a la incubación.
- ✓ La secreción de filamentos cerosos que forman un ovisaco.
- ✓ La secreción de una cera para cubrir su cuerpo y la formación de las verdaderas escamas en los más evolucionados, la familia Diaspididae (Gullan & Cook, 1997).

10.1 Biología de *Dactylopius coccus* Costa

10.1.1 Ciclo de vida y los factores que influyen en su desarrollo

Dactylopius coccus presenta un marcado dimorfismo sexual, donde las hembras tienen el cuerpo oval y convexo, distinguiéndose apenas la cabeza, tórax y abdomen mientras que el macho es

más pequeño y alado. El dimorfismo sexual sin embargo es raro, ya que en más de veinte familias de cóccidos sólo seis lo presentan, entre ellos *Apiomorpha rübsaamen* (Hemiptera: Coccoidea; Eriococcidae) pariente cercano de los Dactylopiidae sólo que de mayor tamaño, la hembra tiene 40 mm de longitud (Cook *et al.*, 2000).

La reproducción de *D. coccus* es sexual o partenogenética (Romero *et al.*, 2006), con una puesta que va desde los 230-596 huevos, estos son depositados individualmente y luego de forma continua observándosele como una cadena, eclosionan aproximadamente a los veinte minutos. Presenta dos estadios ninfales, la ninfa I es la que migra buscando un lugar en el cladodio para fijarse con sus estiletes (aparato bucal) donde pasará el resto de su vida, alimentándose (Marín & Cisneros, 1977). Tras las respectivas mudas, emerge la hembra adulta que mide 2,81 x 1,87 mm. La cópula se da en los siguientes días, lo que ocasionará que la hembra incremente su volumen hasta 6,24 x 4,71 mm, tal cambio se debe a la acumulación de huevos dentro de su sistema reproductor el cual está compuesto por un par de ovarios cada uno de los cuales está formado por aproximadamente 400 ovariolas y el proceso de maduración es asincrónico lo que le permite ovipositar continuamente (Ramírez-Cruz *et al.*, 2008). En el caso del macho la ninfa II se diferencia en protopupa y pupa, el adulto es frágil de 2,2mm de largo y 4,8mm de expansión alar (Palomino, 1998), es de movimiento lento y vive de 3-4 días, porque su aparato bucal es atrofiado. El ciclo biológico de *Dactylopius coccus* varía de 64-114 días para la hembra y de 47 a 70 días para el macho, ello de acuerdo a los factores ambientales (Marín & Cisneros, 1977; Romero *et al.*, 2006). Ambos están cubiertos por una cera blanquecina (coccerina) que los protege de la desecación, de otros factores ambientales y de sus enemigos naturales.

El ciclo de vida de la cochinilla del carmín se ve seriamente afectado por los factores externos, los cuales son cuidados buscando su óptimo desarrollo y una mayor producción del ácido carmínico.

Se ha determinado que uno de los factores bióticos más importantes es la calidad de la planta hospedadora (cactácea). Así se sabe que los cladodios de un año de edad son los más apropiados (Monge *et al.*, 1990), estas plantas deben ser protegidas de las infecciones fúngicas ya que ellas disminuyen la superficie fotosintética de la planta y con ello su metabolismo, no obstante dicha infección en la cochinilla será beneficioso para los productores ya que los individuos aumentaran su contenido de ácido carmínico como mecanismo de defensa, a pesar de ello los factores

abióticos como el fotoperiodo, la temperatura, el riego, etc. tienen un mayor efecto sobre la concentración de ácido carmínico (Rodríguez *et al.*, 2005).

Otro de los factores que reducen la población de cochinilla son sus predadores naturales y la mayor cantidad de entomófagos de cochinilla se encuentran en México (Portillo & Viguera, 2002).

Dentro de los factores abióticos más importantes se encuentran la temperatura y la humedad relativa. Las investigaciones prueban que mientras la temperatura sea más elevada y la humedad relativa más baja el ciclo de vida se acorta, ello se ve reflejado en la distribución natural en el Perú, en quebradas calurosas y secas (Díaz & Quispe, 1989). Así mismo se ha notado que los suelos altoandinos son los más apropiados para el desarrollo de las plantas hospedadoras de cochinilla por su contenido elevado en calcio Ca^{++} y por mantener un pH neutro (Flores, 2002), pero éstas regiones en el Perú tienen una tasa elevada de precipitaciones anualmente por lo que Quispe *et al.* (1990) sugieren que la comunidad de cochinillas debe ser protegida de los factores adversos como lluvias y vientos fuertes ya que generan desprendimiento de los primeros estadios ninfales.

En la búsqueda del incremento de la producción de cochinilla y lidiando con los factores externos antes mencionados se han desarrollado diferentes métodos de infestación dentro de ellos la bolsa de tul y el cladodio cortado (Viguera *et al.*, 2005).

10.1.2 *Dactylopius coccus* Costa y la producción de ácido carmínico

El sistema reproductor femenino de *D. coccus* está asociado con la producción del ácido carmínico. Así, Cortés *et al.* (2005) sugirieron que el tracto reproductor femenino de esta especie es un posible sitio de la síntesis de ácido carmínico. Es común imaginar que una cochinilla mientras más grande sea (la hembra oviplena) mayor será la cantidad de ácido carmínico que contenga, pero Rodríguez *et al.* (2005) demostraron que es todo lo contrario: las cochinillas de mayor peso poseen menor concentración de ácido carmínico dado que el carmín cumple una función defensiva ante los microorganismos y predadores de la cochinilla.

En los insectos el sistema de profenoloxidasa PFO es un mecanismo regulador del sistema inmune comprometido con la defensa ante agentes microbianos y el cierre de heridas, García *et al.* (2002) caracterizaron parcialmente el gen de la profenoloxidasa el cual se sabe está involucrado en la síntesis final del ácido carmínico, pese a que no se conoce a cabalidad la ruta biosintética del mismo se ha sugerido también que existe una participación importante de la hemolinfa del insecto (Lambdin *et al.*, 2002), lo cual conduce a ahondar en las características de dicha hemolinfa. Uno de los trabajos más actualizados al respecto es el de Caselín-Castro *et al.* (2008) gracias al cual se sabe hoy que *D. coccus* tiene cuatro tipos de hemocitos: granulocitos, plasmotocitos, prohemocitos y oenocitos, no obstante dicha investigación sólo menciona datos morfológicos más no explica el rol que cada uno de los hemocitos desempeña, ello sumado a que como se mencionó anteriormente se cree también que este implicado el sistema reproductor femenino del insecto, indica la necesidad de continuar con las investigaciones sobre la ruta metabólica biosintética del ácido carmínico en *D. coccus*.

Ya que los cóccidos (hembra) son sésiles toda su existencia, se ha ahondado poco sobre su ecología o las relaciones que tienen los individuos dentro de la comunidad. Respecto a ello Rodríguez *et al.* (2005) han reportado la existencia de una feromona sexual presente en las hembras emergentes de *D. coccus*, este conocimiento de ser profundizado se convertiría en una herramienta útil para mejorar la producción de cochinilla.

La biotecnología por su parte se ha encargado del análisis del ácido carmínico y su preocupado afán por una obtención a mayor escala del mismo ha llevado a diseñar métodos de cultivo *in vitro* de células madre de cochinilla (González *et al.*, 2002).

Todo muestra que el objetivo principal de las investigaciones en *D. coccus*, cual sea el camino y las herramientas a utilizar es sin lugar a dudas aumentar la producción de la cochinilla y por ende del ácido carmínico. Tanto los entomólogos, como los biotecnólogos, ingenieros industriales, genetistas e investigadores en general, buscan mejorar la calidad del ácido carmínico de *D. coccus*, para lo cual una alternativa es mejorar primero al insecto en sí, lo cual es posible gracias a cruces interespecíficos y una herramienta básica es la citogenética, ya que nos permite conocer el número de cromosomas, el comportamiento mitótico y meiótico de los mismos.